

CHEMISCHE NACHWEISVERFAHREN FÜR DIPTEREX UND DDVP

von

Manfred Berreis

aus

Forchheim

1973 10 7

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

CHEMISCHE NACHWEISVERFAHREN FÜR DIPTEREX UND DDVP

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Manfred Berreis

aus

Forchheim



Dekan: Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Referent: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 23.1.1973

INHALTSVERZEICHNIS

SEITE

1) EINLEITUNG UND VORBEREITUNGSARBEITEN

2) ALLGEMEINE UND BESONDERE VORBEREITUNGSARBEITEN

3) LITERATUR

4) ALLGEMEINE UND BESONDERE LITERATUR

5) ALLGEMEINE LITERATUR

6) BESONDERE LITERATUR

7) ALLGEMEINE LITERATUR

8) BESONDERE LITERATUR

9) SONSTIGES

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit gewidmet

10) ALLGEMEINE UND BESONDERE LITERATUR

11) ALLGEMEINE LITERATUR

12) ALLGEMEINE LITERATUR

13) ALLGEMEINE UND BESONDERE LITERATUR

14) ALLGEMEINE LITERATUR

15) ALLGEMEINE UND BESONDERE LITERATUR

16) ALLGEMEINE UND BESONDERE LITERATUR

17) ALLGEMEINE UND BESONDERE LITERATUR

18) ALLGEMEINE UND BESONDERE LITERATUR



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546313_0017

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A) EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	7
B) ALLGEMEINES ÜBER DIPTEREX UND DDVP	8
I. <u>Dipterex</u>	
1. Wirkstoffe und Handelspräparate	8
2. Herstellungsverfahren	8
3. Physikalische Eigenschaften	10
4. Chemische Eigenschaften	11
5. Umwandlung von Dipterex in DDVP	13
II. <u>DDVP</u>	
1. Wirkstoffe und Handelspräparate	15
2. Herstellungsverfahren	15
3. Physikalische Eigenschaften	17
4. Chemische Eigenschaften	18
C) NACHWEISREAKTIONEN	
I. <u>Nachweis der ungespaltenen Wirkstoffe</u>	20
1. Dünnschichtchromatographie	20
a) Der Nachweis von Dipterex nach WALKER und BEROZA (1963)	20
b) Der Nachweis von DDVP nach SALAME (1964)	28
c) Der Nachweis von Dipterex und DDVP nach DONNER und LOHS (1965)	30
d) Der Nachweis von Dipterex und DDVP nach GUTH (1967)	32

e) Der Nachweis von Dipterex und DDVP nach GETZ und WHEELER (1968)	36
f) Der Nachweis von Dipterex nach SALO und SALMINEN (1966)	40
g) Biochemische Lokalisierung von Dipterex und DDVP nach ACKERMANN (1968)	41
2. Papierchromatographie	
a) Der Nachweis von Dipterex nach MACRAE und McKINLEY (1961)	54
b) Biochemisches Verfahren nach COOK (1955)	60
c) Der Nachweis von Dipterex nach MITCHEL (1961)	66
3. Colorimetrisches Verfahren (Farbreaktion nach SCHÖNEMANN) nach LOHS und DONNER (1966)	78
II. <u>Nachweis von Spaltstücken und Molekül- stücken</u>	
1. Phosphornachweis mit HANES-ISHERWOOD- Reagens nach YAMASHITA (1961)	81
2. Qualitativer Chlornachweis nach YAMASHITA (1961)	82
3. Quantitativer Chlornachweis nach BENNEWITZ und FOTH (1967)	83
4. Reduktion von Kaliumpermanganat nach YAMASHITA (1961)	89

	Seite
5. Chromotropsäuremethode* nach YAMASHITA (1961)	90
6. Jodometrische Methode nach GEIGER und FÜRER (1960)	92
7. Die Dichromatoxydation von Dipterex und der Pyridinalkali-FUJIWARA-Test nach GIANG, BARTHEL und HALL (1954)	99
8. Der Nachweis von Dipterex durch Spal- tung der Phosphorcarbonbindung bei 70° C zum Phosphitester und dessen Reaktion mit 3,5-dinitrobenzoëssäure in wässrigem Na-bicarbonat nach MUSTAFA und Mitarb. (1966)	103
 III. <u>Der Nachweis von Dipterex und DDVP in</u> <u>Rückständen nach der Agar-Diffusions-</u> <u>methode nach ACKERMANN, ENGST und FECHNER</u> <u>(1968)</u>	
 D) METABOLISMUS	 111
I. <u>Toleranzentwicklung bei kontinuierlicher</u> <u>Verabreichung von Dipterex nach SHIMAMOTO</u> <u>und HATTORI (1966)</u>	111
1. Abbaugeschwindigkeit von Dipterex nach SCHWARZ und DEDEK (1965)	112
2. Hauptabbauwege von Dipterex nach ARTHUR und CASIDA (1957)	117

II.	<u>DDVP-Abbau [Einfluß von Aktivatoren (Metallionen)] nach HODGSON und CASIDA (1962)</u>	119
III.	<u>Gegengiftmaßnahmen (Atropin, P₂AM, Toxogonin), Grenzen der Antidotwirk- samkeit nach JAKUES (1964)</u>	124
E)	DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG	127
F)	LITERATURVERZEICHNIS	133

A) EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Seit die insektizide Wirksamkeit der organophosphatischen Substanzen bestätigt wurde, sind sehr viele Typen davon entwickelt worden und es hat eine weite Verbreitung eingesetzt. Im Anschluß an die Entwicklung dieser phosphororganischen Verbindungen hat man erkannt, daß diese Agentien nicht nur für Insekten eine starke Toxizität besitzen, sondern auch für Warmblüter. Dieser großen Toxizität wegen sind sie in zunehmendem Maße zu Selbstmordzwecken oder zu Mordzwecken verwendet worden. Infolgedessen ist ihr Nachweis und ihre Unterscheidung für die gerichtsmedizinische Chemie sehr wichtig.

Nichtsdestotrotz gibt es bisher nur sehr wenig Studien über Nachweismöglichkeiten und besonders über die Differenzierung von Dipterex und DDVP. In der hier vorliegenden Arbeit habe ich versucht chemische Nachweismethoden für die organophosphatischen Verbindungen Dipterex und DDVP zu sammeln, sowie anhand einiger Studien kurz auf den Stoffwechsel dieser Verbindungen einzugehen.

II.	<u>DDVP-Abbau [Einfluß von Aktivatoren (Metallionen)] nach HODGSON und CASIDA (1962)</u>	119
III.	<u>Gegengiftmaßnahmen (Atropin, P₂AM, Toxogonin), Grenzen der Antidotwirk- samkeit nach JAQUES (1964)</u>	124
E)	DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG	127
F)	LITERATURVERZEICHNIS	133

A) EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

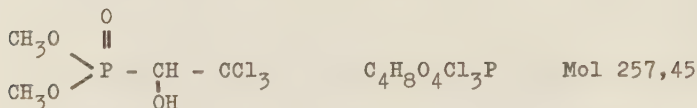
Seit die insektizide Wirksamkeit der organophosphatischen Substanzen bestätigt wurde, sind sehr viele Typen davon entwickelt worden und es hat eine weite Verbreitung eingesetzt. Im Anschluß an die Entwicklung dieser phosphororganischen Verbindungen hat man erkannt, daß diese Agentien nicht nur für Insekten eine starke Toxizität besitzen, sondern auch für Warmblüter. Dieser großen Toxizität wegen sind sie in zunehmendem Maße zu Selbstmordzwecken oder zu Mordzwecken verwendet worden. Infolgedessen ist ihr Nachweis und ihre Unterscheidung für die gerichtsmedizinische Chemie sehr wichtig.

Nichtsdestotrotz gibt es bisher nur sehr wenig Studien über Nachweismöglichkeiten und besonders über die Differenzierung von Dipterex und DDVP. In der hier vorliegenden Arbeit habe ich versucht chemische Nachweismethoden für die organophosphatischen Verbindungen Dipterex und DDVP zu sammeln, sowie anhand einiger Studien kurz auf den Stoffwechsel dieser Verbindungen einzugehen.

B) ALLGEMEINES ÜBER DIPTEREX UND DDVP

I. Dipterex^R

1. Wirkstoffe und Handelspräparate:



Chemische Bezeichnung:

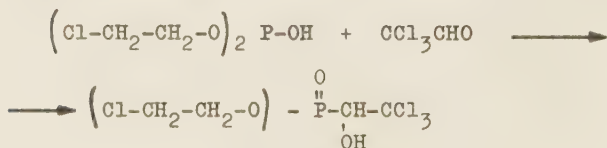
O,O-Dimethyl(1-hydroxy-2,2,2-trichloroäthyl)-phosphonat.

Andere Bezeichnungen sind:

Dylox^R, "Trichlorfon", Bayer L 13/59, Tugon^R, Neguvon^R.

2. Herstellungsverfahren:

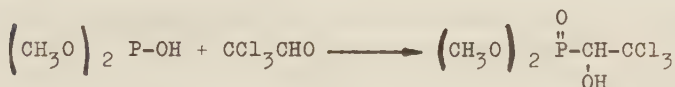
Der Werdegang des Phosphorsäureesters Dipterex ist sehr interessant. 1945 beschäftigten sich W.E. CRAIG und W.F. HESTER in den USA mit der Anlagerung von Dialkylphosphiten an Aldehyde. Neben anderen chlorierten Aldehyden wurde auch Chloral in den Kreis der Untersuchungen gezogen. Vorwiegend wurden die Dialkylphosphite chlorhaltiger Alkohole mit Chloral zur Reaktion gebracht.



Das Anfangsglied der Reihe, das Dimethylphosphit, wurde jedoch nicht mit Chloral umgesetzt. Eine gewisse insektizide Wirkung der Kondensationsprodukte wurde erkannt, das Arbeitsgebiet aber nicht weiter verfolgt.

1951 kondensierten Schweizer Chemiker Dimethylphosphit mit Chloral. Die erhaltene Verbindung wurde als Zwischenprodukt behandelt und gleich weiter mit Triäthylphosphit bei höheren Temperaturen umgesetzt.

1952 beschäftigten sich im Pflanzenschutz-Laboratorium der Farbenfabriken Bayer, Elberfeld, die Forschergruppe SCHRADER mit der Einwirkung von Aldehyden auf Dialkylphosphite. W. LORENZ setzt Dimethylphosphit mit Chloral um:



Bei der Prüfung des erhaltenen Produktes wird die starke insektizide Wirkung erkannt.

Unabhängig von der Elberfelder Forschergruppe wurde 1954 in den USA das Kondensationsprodukt aus Dimethylphosphit und Chloral untersucht und dabei seine insektizide Wirkung festgestellt. Später beschäftigten sich auch japanische Forscher mit der Kondensation und Umwandlung von Dipterex.

Schließlich sind in der letzten Zeit noch einige spezielle Verfahren zur Herstellung von Dipterex bekannt geworden.

3. Physikalische Eigenschaften

Dipterex ist ein weißes, kristallines Pulver von angenehmen Geruch, das bei $83^{\circ} - 84^{\circ} \text{ C}$ schmilzt. Aus der Molekulargewichtsbestimmung geht hervor, daß Dipterex bimolekular ist (Gefunden: Mol 505, berechnet: Mol 514,90).

Dipterex ist in Alkohol, Benzol und den meisten chlorierten Kohlenwasserstoffen löslich. Von Diäthyläther und Tetrachlorkohlenstoff wird der Stoff wenig gelöst. Bei Zimmertemperatur ist Dipterex unbegrenzt haltbar. Wässrige Lösungen werden bei längerem Lagern sauer. Bei pH-Werten über 5,5 geht Dipterex langsam in DDVP über.

Tabelle 1 Siedepunkte, Dampfdruck und Flüchtigkeit von Dipterex

Kp		p		V
0,08 mm Hg	96° C	20°	$7,8 \cdot 10^{-6} \text{ mm Hg}$	0,11 mg/cbm
0,1 mm Hg	100° C			
0,15 mm Hg	106° C	30°	$28 \cdot 10^{-6} \text{ mm Hg}$	0,38 mg/cbm
0,2 mm Hg	109° C			
0,3 mm Hg	114° C	40°	$111 \cdot 10^{-6} \text{ mm Hg}$	1,45 mg/cbm

d_4^{20} 1,73; Brechungsindex einer 10 %igen wässrigen Lösung n_D^{20} 1,3439. Mit steigender Temperatur löst sich Dipterex erheblich in Wasser.

Die Löslichkeit von Dipterex in organischen Lösungsmitteln ist ebenfalls bestimmt.

Tabelle 2

Löslichkeit in Wasser (g in 100 ccm)		Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln bei 25° C (g in 100 ccm)	
10° C	11,4 g	in n-Hexan	0,08 g
15° C	12,3 g	in n-Pentan	0,10 g
25° C	15,4 g	in Benzol	15,2 g
30° C	18,4 g	in Diäthyläther	17,0 g
35° C	24,2 g	in Chloroform	75,0 g

4. Chemische Eigenschaften

Die Zersetzung von Dipterex in Wasser bei saurer Reaktion erfolgt anscheinend zunächst an einer Methylestergruppe. Erst wenn diese abgespalten ist, können auch Chlorionen nachgewiesen werden.



Es ergeben sich dabei für die Bestimmung der 50 %igen Verseifung in saurer Lösung (pH = 1,2) bei 70° C zwei Werte, je nachdem ob die Bestimmung a) potentiometrisch oder b) argentometrisch vorgenommen wird:

- a) potentiometrisch: 19 Stunden
- b) argentometrisch: 35 Stunden

Die Halbwertszeiten von Dipterex bei Temperaturen von 10° - 70° C und pH-Werten von 1-8 wurden gemessen:

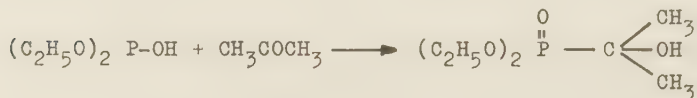
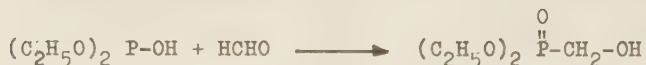
Tabelle 3 50 %ige Verseifung bei verschiedenen Temperaturen in Tagen (gemessen im pH-Bereich 1-5):

10°	20°	30°	40°	50°	60°	70°
2400	526	140	41	10,7	3,2	1,13

Tabelle 4 50 %ige Verseifung bei verschiedenen pH-Werten in Stunden (gemessen bei 70° C):

pH	1	2	3	4	5	6	7	8
	32	34	33	26,6	15,3	3,0	0,7	0,6

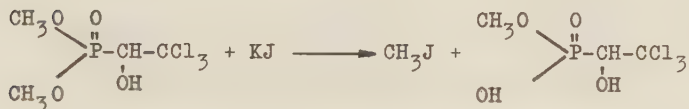
Bekanntlich entstehen α -Oxy-Phosphorsäureester durch Anlagern von Dialkylphosphiten an die Carbonylgruppe eines Aldehyds oder Ketons:



Entsprechend erfolgt auch die Darstellung von Dipterex. Die Hydroxylgruppe in der Molekel Dipterex kann weiter

verändert, z.B. acyliert werden. Bei der Hydrolyse der acylierten Verbindungen wird der Acylrest wieder abgespalten.

Die Molekel Dipterex ist - genau wie Methylparathion - ein Methylierungsmittel. Kaliumjodid wird z. B. von Dipterex in Methyljodid übergeführt. Die dabei entstandene Estersäure kann in guter Ausbeute gewonnen werden:



5. Umwandlung von Dipterex in DDVP

Dipterex geht in wässriger Lösung bei alkalischer Reaktion durch Abspalten von Chlorwasserstoff und Umlagern in DDVP über:



Die Umlagerung beginnt schon bei einem pH-Wert von etwa 5,5, wie aus folgender Tabelle hervorgeht:

Tabelle 5 Umwandlung von Dipterex in DDVP:
(gemessen nach halbstündigem Erwärmen einer
wässrigen P^{32} -markierten Dipterexlösung auf
 $70^{\circ} C$)

pH	Dipterex	DDVP	Hydrolysenprodukte
1	98,5 %	0,5 %	1 %
5	96,2 %	1,6 %	1,6 %
6	72,2 %	21,6 %	6,2 %
7	3 %	58,5 %	38,5 %

R.L. METCALF und Mitarb. bestimmten den Übergang von Dipterex in DDVP bei Zimmertemperatur und bei pH-Werten von 6 - 8.

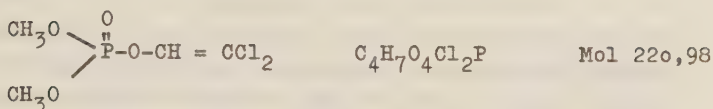
Tabelle 6 50 %ige Umwandlung von Dipterex in DDVP
bei Zimmertemperatur:

pH	6	7	8
Stunden	89	min 386	min 68

Die angegebenen Zahlen zeigen deutlich die Abhängigkeit des Überganges von Dipterex in DDVP von der Temperatur und von den pH-Werten.

II. DDVP

1. Wirkstoffe und Handelspräparate:



Chemische Bezeichnung:

O,O-Dimethyl-O-(2,2-dichlor-vinyl)-phosphat.

Andere Bezeichnungen sind:

Nuvan^R, Vapona^R, "Dichlorphos"

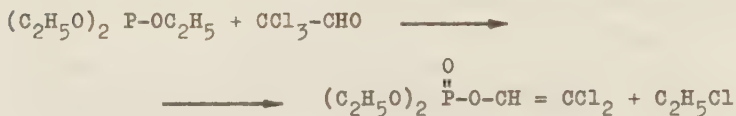
DDVP (Abkürzung für Dimethyl-Dichlor-Vinyl-Phosphat) gehört zu der großen Gruppe der Enolphosphate, die in einer "anormalen" Michaelis-Arbusov-Reaktion aus α -Halogen-Carbonyl-Verbindungen und Trialkylphosphiten entstehen.

2. Herstellungsverfahren:

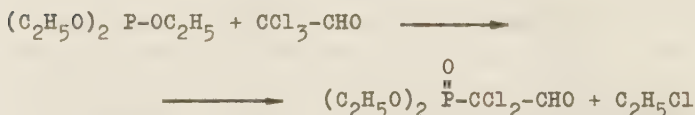
Die Geschichte des Wirkstoffes DDVP ist interessant. Sie zeigt, daß etwa zur gleichen Zeit Forschergruppen in den USA, in der Sowjetunion, der Schweiz und Westdeutschland mit der Aufklärung der Einwirkungsprodukte von Polyhalogenaldehyden auf Trialkylphosphite beschäftigt waren. Da die Forschungsabteilungen der chemischen Großindustrie ihre Ergebnisse meist in Form von Patentanmeldungen veröffentlichen, die bis zum Bekanntwerden einen längeren Zeitraum

benötigen, ist die Entwicklungsgeschichte des Insektizids DDVP häufig falsch wiedergegeben. Anhand des heute vorliegenden Schrifttums ergibt sich folgendes Bild:

1948 reichte in den USA die Shell Development Co. ein Patent ein, das generell die Umsetzung von Trialkylphosphiten mit Chloral unter Schutz stellt. Kurze Zeit später beanspruchte die amerikanische Firma Food Machinery and Chemical Corp. in England die Kondensationsprodukte aus Trialkylphosphiten und Chloral. Das aus Chloral und Triäthylphosphit resultierende Produkt wird in seiner Konstitution klar erkannt:



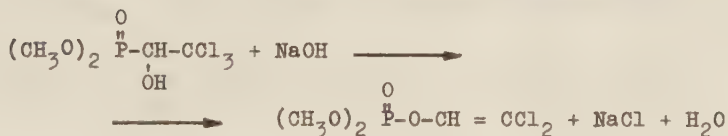
1951 veröffentlichten in der Sowjetunion A.E. ARBUSOV und P.I. ALIMOV eine Arbeit über die Einwirkung von Chloral auf Triäthylphosphit. Die Umsetzung wird als eine echte Michaelis-Arbusov-Reaktion angenommen:



Auf insektizide Eigenschaften wurde das erhaltene Produkt jedoch nicht untersucht !

In der Schweiz ließ sich 1951 die Ciba AG. mit dem Sz.P. 310 395 die Umsetzung von Trimethylphosphit mit Chloral schützen. Das Umsetzungsprodukt wird richtig als O,O-Diäthyl-O-(2,2-dichlor-vinyl)-phosphat gedeutet (W. PERKOW).

Unabhängig von den genannten Arbeiten stellte die unter der Leitung von G. SCHRADER stehende Forschungsgruppe der Farbenfabriken Bayer AG/Elberfeld aus dem O,O-Dimethyl-(1-hydroxy-2.2.2-trichloräthyl)-phosphonat durch Abspalten von Chlorwasserstoff und Umlagern im Jahre 1954 das Dimethyldichlor-vinyl-phosphat (DDVP) her.



Ein Jahr später beschäftigten sich mit der gleichen Reaktion amerikanische Forscher. Die Arbeiten werden dann auch von sowjetischer Seite aufgenommen und bestätigt.

3. Physikalische Eigenschaften

DDVP ist eine farblose, etwa 1 %ig in Wasser lösliche Flüssigkeit von angenehmen Geruch, die sich in den meisten organischen Lösungsmitteln gut löst. In Glycerin lösen sich bei Zimmertemperatur 0,5 %.

Charakteristisch für die schnelle Wirkung von DDVP - besonders bei Dipteren - ist die hohe Flüchtigkeit dieses leicht zugänglichen Insektizides. DDVP siedet

bei 74° C unter einem Druck von 1 mm Hg.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über Dampfdruck und Flüchtigkeit bei den gebräuchlichsten Temperaturen:

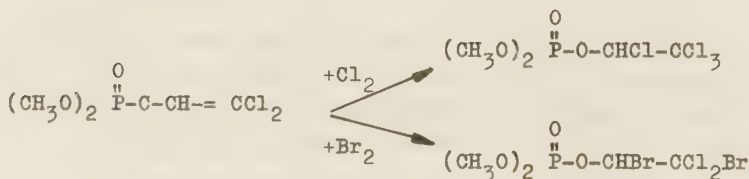
Tabelle 7

0,05 mm Hg	35° C	10° C	$4,5 \cdot 10^{-3}$ mm Hg	56 mg/cbm
0,2 mm Hg	53° C			
0,6 mm Hg	67° C	20° C	$1,2 \cdot 10^{-2}$ mm Hg	145 mg/cbm
1,0 mm Hg	74° C			
2,5 mm Hg	91° C	30° C	$3,0 \cdot 10^{-2}$ mm Hg	350 mg/cbm
11,0 mm Hg	114° C	40° C	$7,0 \cdot 10^{-2}$ mm Hg	800 mg/cbm

n_D^{20} 1,4541; d_4^{20} 1,420

4. Chemische Eigenschaften

DDVP enthält in einer Estergruppe eine Doppelbindung. Infolgedessen addiert die Molekel DDVP sehr leicht Halogene:



Die Zersetzung von DDVP durch Wasser geht aus der folgenden Tabelle hervor:

Tabelle 8 50 %ige Verseifung von DDVP bei verschiedenen Temperaturen in Tagen:

0°	10°	20°	30°	40°	50°	60°	70° C
1030	240	61,5	17,3	5,8	1,6	0,58	0,16

Tabelle 9 50 %ige Verseifung in verschiedenen pH-Werten in Stunden (gemessen bei 70° C):

pH	2	3	4	5	6	7
	3,4	3,4	3	2,8	1,4	0,45

C) NACHWEISREAKTIONEN

I. Nachweis der ungespaltenen Wirkstoffe:

1. Dünnschichtchromatographie

a) Der Nachweis von Dipterex nach WALKER und BEROZA (1963)

Silica gel G (Fa. Brinkman Instruments Inc. oder Fa. Microchemical Specialities Co. Berkeley 3 Calif.) erwies sich in den meisten Fällen wie auch hier als günstigstes Adsorptionsmaterial. Bei der Beschichtung der Glasplatten ging man folgendermaßen vor:

30 mg Silica Gel G werden in einem Porzellanmörser mit 40 ml aqua dest. ~ 30 sec lang zermahlen. Man füge zusätzlich noch 20 ml Wasser hinzu und zermahle das Ganze nochmals 30 - 40 sec.

Danach stelle man unverzüglich eine Lage von 275 m/ μ Dicke auf den Glasplatten her, was mit dem Applikationsgerät nach STAHL (Fa. Brinkman Instruments Inc. Great Neck, N.Y.) keine Schwierigkeiten bereitet. Die Glasplatten sind 200 mm lang und 200 mm breit. Nach der Applikation des Silica Gel G aktiviere man die Platten in vertikaler Position bei 130° C ~ 30 min lang. Danach bringt man die Platten in einen Trockenapparat und läßt sie schließlich abkühlen. Bis zu ihrer DSC-Verwertung werden sie hier gelagert.

Vorbereitungen:

Es wird eine 1 %ige Lösung des kommerziell erhältlichen Dipterex in Äthylacetat hergestellt.

Lösungsmittelsysteme:

Die Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert. Die Systeme bestanden aus:

- a) Chloroform
- b) Chloroform : Äthyläther (9+1)
- c) Chloroform : Äthylacetat (9+1)
- d) Chloroform : Aceton (9+1)
- e) Chloroform : Methylalkohol (9+1)
- f) Chloroform : Essigsäure (9+1)

schließlich wurde Chloroform in einer 2. und 3. Versuchsreihe durch Benzin und Hexan ersetzt.

Chromogene Reagentien:

a) Eine 5 %ige Lösung von Brom in Tetrachlorkohlenstoff wurde als Bromdampfquelle benutzt. b) Die Fluoreszinlösung von MITCHEL (1961) wurde modifiziert, indem 1 ml der konzentrierten Fluoreszinlösung (0,25 % W/V Fluoreszin in N,N-Dimethylformamid) mit 50 ml Äthylalkohol anstatt mit 200 ml verdünnt wird und c) das Silbernitratreagens nach MITCHEL (1961) (man füge 1 Lösung von 1,7 g Silbernitrat in 5 ml Wasser zu 10 ml Phenoxyäthanol und verdünne das Ganze mit Aceton auf 200 ml).

UV-Quelle:

Zwei General Electric Model G 15 T 8, 15 Watt Germicidallampen nach Art einer verstellbaren Schwingarmschreibtischlampe montiert.

Versuchsdurchführung:

2 cm von der untersten Kante entfernt werden 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,2, 0,1 μ g Portionen der Pestizidlösung auf die Platte aufgetragen. In die Trennkammer gibt man nun soviel Lösungsmittel, bis die Flüssigkeitshöhe 1 cm beträgt (~ 200 ml). Man läßt das Ganze nun bei 30° C 30 min lang stehen, damit es ins Gleichgewicht kommt. Die Platten werden daraufhin in die Trennkammer eingebracht, sodaß die Entwicklung beginnen kann. (30 min für Lösungsmittelsysteme auf Chloroformbasis, 20 min für das Benzin- und für das Hexansystem). Die Entwicklungsdistanz sollte 10 cm betragen. Die Lösungsmittelfront wird markiert. 5 min nach der Entwicklung hänge man die Platte 30 sec lang in einer Kammer auf, die das Bromreagens enthält und man besprühe sie mit der Fluoreszinlösung (einige Flecken erscheinen) und danach mit dem Silbernitratreagens. Man setze die Platten 7 min lang der UV-Lichtquelle aus und berechne die Rf-Werte der einzelnen Flecken.

Ergebnis:

Mit Ausnahme der Lösungsmittelsysteme die Essigsäure enthalten ergeben sich generell glänzende, grüngelbe Flecken auf einem rosa Hintergrund, wenn sie mit Bromdampf behandelt werden und anschließend mit Fluoreszin und dem Silbernitratreagens übersprüht wurden. Nach der UV-Bestrahlung wurden die Flecken gelb. Bei den Systemen die Essigsäure enthielten, blieb der Hintergrund weiß und die Flecken waren sichtbar aber nicht unterscheidbar.

Tabelle 10 Rf-Werte für Dipterex für die einzelnen Lösungsmittelsysteme

	CHCl ₃	(9+1) CHCl ₃ - Äther	(9+1) CHCl ₃ - Äthac	(9+1) CHCl ₃ - Aceton	(9+1) CHCl ₃ - MeOH	(9+1) CHCl ₃ - HOAc
Rf Dipterex	0,03	0,04	0,06	0,10	0,51	0,39

	Benzin	(9+1) Benzin- Äther	(9+1) Benzin- Äthac	(9+1) Benzin- Aceton	(9+1) Benzin- MeOH	(9+1) Benzin- HOAc
Rf Dipterex	0	0	0	0,03	0,25	0,17

	Hexan	(9+1) Hexan- Äther	(9+1) Hexan- Äthac	(9+1) Hexan- Aceton	(9+2) Hexan- Aceton	(9+1) Hexan- MeOH	(9+1) Hexan- HOAc
Rf Dipterex	0	0	0	0	0,04	0,07	0,04

Die Nachweismenge betrug dabei 2 µg; wenn man Joddampf als Chromogenagens verwendet, beträgt die Nachweismenge bei 5 minütiger Einwirkungsdauer 5 µg.

Diskussion:

Zu dem Problem "Lösungsmittelsystem" sei folgendes bemerkt:

Lösungsmittelsysteme werden aus einem Grundlösungsmittel (Hexan, Benzin, Chloroform) und einem Fluierlösungsmittel zusammengestellt, wobei jeder einzelne Bestandteil einen anderen Grundcharakter besitzt; Er ist z.B. ein Äther, Ester, Keton, Alkohol oder eine Säure (Amine, Nitrile, Sulfone, Sulfoxide sind Beispiele anderer Gattungen, die verwendet werden können). Die Lösungsmittel die ausgewählt wurden waren flüchtig (mit Ausnahme der Essigsäure), sodaß, nachdem die Platten entwickelt waren, nur kurze Wartezeit (5 min) nötig war, ehe sie mit den Chromogenreagentien besprüht werden konnten. Allgemein zeigt Hexan als Grundlösungsmittel den besten Erfolg, wenn es mit Verbindungen niederer Polarität angewendet wird, Benzin und Chloroform aber mit Verbindungen größerer Polarität. Je nach Konzentration der Fluierlösung im Grundlösungsmittelsystem bewegt sich die untersuchte Substanz mehr oder weniger.

Im Hinblick auf "clean up" dürfte es wichtig sein, ein Lösungsmittelsystem auszuwählen, in das sich kein Fremdmaterial einmengt. Welches der 19 Lösungsmittelsysteme sich als geeignetstes erweist, hängt von der einzelnen Mischung ab, die verwendet wird. Versuche mit Extrakten, die keine Pestizide enthalten, können die sog. "Fenster" aufzeigen. Lösungsmittelsysteme die die Pestizide in dieses Fenster applizieren, können daraufhin ausgewählt werden. Denn falls der Betrag an Fremdmaterial übermäßig ist, kann er den Rf-Wert verändern. Gewöhnlich ist ein einleitender Extraktversuch wie z.B. mit Acetonitrilhexan wünschenswert oder notwendig, um Fremdmaterial aus einem Pflanzen- oder Tierpräparat loszuwerden, ehe man

die Chromatographie durchführt. Falls die Reinigung nicht ausgeführt wird, so kann sich das Fremdmaterial vom Start bis zur Lösungsmittelfront chromatographieren. Ein Hexan-extrakt aus Kopfsalat z.B. ergab einen Vielfarbenstreifen vom Start bis zur Lösungsmittelfront.

Auswirkung von Aktivierung und Lagerzeit der Platten auf die Rf-Werte:

Wenn man die Dauer der Aktivierungstemperatur von 130° C zwischen 30 und 120 min variierte, so beobachtete man nur die gewöhnlichen, kleinen zufälligen Unterschiede bei den Rf-Werten. Eine Lagerung der Platten von beispielsweise 3 Tagen beeinflußt die Rf-Werte nicht merkbar. Die Angaben zeigten, daß die Aktivierungszeit und die Lagerzeit der Platten nicht kritisch waren.

Die Art und Weise, wie die Platten während der Aktivierung im Ofen gehalten werden, können allerdings Schwierigkeiten verursachen.

Platten, die in horizontaler Lage getrocknet werden, neigten dazu an der Unterseite Feuchtigkeit anzusammeln, außerdem trockneten die behafteten Oberflächen nicht gleichmäßig. Dieser Schwierigkeit konnte man dadurch aus dem Weg gehen, daß man die Platten in vertikaler Richtung hielt. In der Entwicklungskammer sollten die Platten so angeordnet werden, daß die Seiten parallel zur Entwicklungsrichtung sind (vertikal). Die Materialien werden zum Rand der Platten hinlaufen, wenn sie nicht eben genug angeordnet sind. Die Ergebnisse sind einheitlicher, wenn man die Analysen in einer Kammer durchführt, die eine konstante Temperatur einige Grad

über Zimmertemperatur ($\rightarrow 30^{\circ}\text{C}$) aufweist.

Sobald man die Platten mit flüssigem Brom behandelte, resultierte ein ungleichmäßiger Überzug der sich am Ende der Platte konzentrierte. Überschuß an Brom verhindert, daß ein rosa Hintergrund erscheint, wenn man nachher bei der Entwicklung Fluoreszin sprüht - und außerdem waren die Flecken nicht sichtbar. Bei Anwendung von 5 % Brom in Carbontetrachlorid ergab sich ein gleichmäßiger Überzug und 30 sec reichten aus, um gute Flecken zu erzielen. Nachdem die Platte der Kammer entnommen war, zerstreute man den Bromüberschuß in weniger als 30 sec. Die vierfache Konzentration von MITCHEL's Fluoreszinspray gestattete eine bessere Entwicklung des rosa Hintergrundes, ohne daß man zuviel Spray auf die Platte aufbringen mußte.

Schließlich sei noch erwähnt, daß die Platten sauber sein müssen, wenn die Beläge gleichmäßig und die Haftungen gut sein sollen. Die Anwendung von Scheuerpulver und Reinigungsmitteln ergaben saubere Platten. Es wurde jedoch für nötig befunden, die Platten nach jeder 5. Benutzung mit einer Chromschwefellösung zu säubern.

STANLEY (1964) regte daher die Verwendung von Microplatten (25,4 mm x 76,2 mm) an Stelle der Standardplatten (200 mm x 200 mm) an, was nach seiner Meinung eine ökonomische, schnelle DSC-Methode darstellen würde, denn diese Platten können nach Gebrauch weggeworfen werden. Die Microplatten erfordern weniger Lösungsmittel und weniger Zeit zur Entwicklung. Die Rf-Werte unterscheiden sich natürlich von den Rf-Werten, die man auf den Standardplatten erhält.

Tabelle 11 Rf-Werte für Dipterex und DDVP auf Microchromatoplaten. Laufstrecke 5 cm, feste Phase Silica Gel G

Pestizid	Lösungsmittel						Chromogenagens
	Cyclohexan	Benzin	Aceton	Essigsäure	Isopropanol	Methanol	
Dipterex	0	0	0,88 0,98	1,0	0,82 0,97	0,88 0,98	AgNO ₃
DDVP	0	0	0 0,93	0 0,93	0 0,75	0 0,82	AgNO ₃

Falls eine Streifung auftrat, so benutzte man die extremen Enden der Flecken zur Berechnung der Rf-Werte. Wenn ein einzelner Rf-Wert angegeben ist, betrug die Weite des Fleckens $\pm 0,03$.

J. BECK und M. SHERMAN (1968) gaben eine Methode an, die ebenfalls auf dem Cl-Nachweis durch AgNO₃ beruhte und die sich als wirksam für die Bestimmung des Verdauungskanalinhaltess erwies (Versuchstiere: Ratten und Hühnchen, mit doppelter LD₅₀-Dosis vergiftet). Es handelte sich dabei um eine qualitative dünn-schichtchromatographische Methode zur Trennung von DDVP (I) und Dipterex (VI). Verbindungen wie Dimethoat (II), Malathion (III), Methylparathion (IV) und Parathion (V) konnten ebenfalls getrennt werden. Als Adsorptionsschicht wurden 20 g Silica Gel G verwendet, das mit 45 ml H₂O in einem Plastikbehälter 1 min lang geschüttelt wurde. Das Gemisch wurde für vier 20 x 20 cm Platten verwendet, indem 0,25 mm dicke Schichten hergestellt wurden, die dann in einem Ofen bei 105° C 1 Stunde lang aktiviert wurden. Für die H₂O-löslichen Verbindungen II, VI und I wurden die Lösungsmittel CHCl₃-Me₂CO

(1:1) verwendet und für die weniger H_2O -löslichen Verbindungen III, IV und V wurden die Lösungsmittel $CHCl_3-CCl_4$ (1:1) verwendet. Dipterex und DDVP ergaben als Cl enthaltende Verbindungen dunkelviolette Flecken nach Zugabe des $AgNO_3$ -Sprays, nachdem sie bei $50^\circ C$ 10 min lang erhitzt wurden. Die p-Nitrophenyl-Hälfte von V und IV ergab gelbe Flecken nachdem sie mit alk. NaOH besprüht und 20 min lang auf $100^\circ C$ erhitzt wurde. I und III ergaben braune Flecken, nachdem sie mit $P Cl_2$ besprüht und 15 min lang bei $50^\circ C$ erhitzt wurden.

Es sei schließlich noch erwähnt, daß auch KOLYAKOVA USSR(1968) zur Durchführung der DSC-Nachweise die gleichen Chromogenreagentien verwendete, wie sie von WALKER und BEROZA angegeben wurden.

b) Der Nachweis von DDVP nach SALAME (1964)

Diese Methode kann sowohl auf die DSC als auch auf die Papierchromatographie (MACRAE und McKINLEY 1961, siehe Papierchromatographie S. 54) angewendet werden und liefert hier wie dort gleich gute Ergebnisse. Ein besonderer Vorteil dieser Methode liegt auch darin, daß sie den Nachweis einer großen Anzahl phosphororganischer Pestizide gestattet (Phosphate und Thiophosphate).

Entwicklungsverfahren:

Der Fleck wird 10 min lang Bromdämpfen ausgesetzt und dann mit einer Lösung von 0,1 % $FeCl_3$ in 80 % Alkohol eingesprüht; dann läßt man die Platten 15 min lang

trocknen. Die nicht gebundenen Ferri-ionen macht man mit Hilfe der 1 % Sulfosalicylsäurelösung in 80 % Alkohol sichtbar. Es ergeben sich weiße Flecken auf einem malvenfarbenen Hintergrund. Die Empfindlichkeit liegt in der Größenordnung von 5 μ g.

Ergebnisse:

Tabelle 12 Rf-Werte für DDVP unter Verwendung verschiedener Fließmittelsysteme

Fließmittel	Ea ₁	Ea ₂	Ea ₃	Ec ₁	Ec ₂	Ec ₃	Eac ₁	Eac ₂
DDVP	0,18	0,30	0,98	0	0,36	0,37	0,21	0,60

Fließmittel	Eet ₁	Eet ₂	Em ₁	Em ₂	Em ₃	Bc ₄	Bae ₃	Bae ₄
DDVP	0,13	0,24	0,15	0,17	0,18	0,34	0,31	0,34

Ea ₁	=	Petroläther-Aceton	(90:10)
Ea ₂	=	Petroläther-Aceton	(75:25)
Ea ₃	=	Petroläther-Aceton	(50:50)
Ec ₁	=	Petroläther-Chloroform	(90:10)
Ec ₂	=	Petroläther-Chloroform	(50:50)
Ec ₃	=	Petroläther-Chloroform	(10:90)
Eac ₁	=	Petroläther-Äthylacetat	(75:25)
Eac ₂	=	Petroläther-Äthylacetat	(50:50)

Eet ₁	= Petroläther-Äthanol	(97,5:2,5)
Eet ₂	= Petroläther-Äthanol	(95 : 5)
Em ₁	= Petroläther-Methanol	(98 : 2)
Em ₂	= Petroläther-Methanol	(95 : 5)
Em ₃	= Petroläther-Methanol	(90:10)
Bc ₄	= Benzin-Chloroform	(50:50)
Bae ₃	= Benzin-Äthylacetat	(95 : 5)
Bae ₄	= Benzin-Äthylacetat	(90:10)

c) Der Nachweis von Dipterex und DDVP nach DONNER und LOHS (1965)

Als Laufmittel wurde das von KLEMENT und WILD angegebene Hexan-Benzol-Methanol (2:1:1) Gemisch und ein Hexan-Benzol-Äther (6:1:1) Gemisch verwendet. Beide Laufmittel ergänzen sich in ihren Trenneigenschaften und sie werden nachfolgend als Laufmittel 1 und 2 bezeichnet. Nach dem Besprühen mit einer 1 %igen acetonischen Lösung von Kobaltchlorid (wasserfrei) und dem Verdunsten des Lösungsmittels zeigen sich blaue Flecken, die bereits in der Kälte (bei kleinen Mengen phosphororganischer Ester nach Erwärmen auf 40-50° C) innerhalb von 1-2 min sichtbar werden. Wasserhaltige Kobaltchloridlösungen erfordern ein nachträgliches Trocknen der Dünnschichtplatte im Trockenschrank; allerdings sind die hierbei nach dem Abkühlen sich abzeichnenden Farbflecke diffus bzw. unscharf gezeichnet.

Abhängigkeit der Nachweisgrenze vom Adsorbens:

Es ergab sich, daß die Empfindlichkeit des Nachweises mit Kobaltchlorid als Sprühmittel nicht wesentlich vom Adsorbens abhängt. Es wurden Kieselgel G, Charge 30701, vom VEB Chemiewerk Greiz-Dörlau, Kieselgel G der Fa. Merck AG, sowie Aluminiumoxid G vom VEB Chemiewerk Greiz-Dörlau verwendet.

Ergebnisse:

Tabelle 13 Rf-Werte für DDVP, Äthyl- Propyl-Butyl-
dipterex unter Verwendung der Laufmittel
1 und 2

	Laufmittel 1	Laufmittel 2
DDVP	0,48	0,21
Äthyl-dipterex	0,29	0,06
Propyl-dipterex	0,34	0,19
Butyl-dipterex	0,46	0,31

d) Der Nachweis von Dipterex und DDVP nach GUTH (1967)

Die von GUTH verwendeten Laufmittel sind in nachfolgender Tabelle angegeben.

Tabelle 14

Laufmittel Nr.	Laufmittel	Reinheitsgrad	Bezugs- quelle
1	Tetrachlorkohlenstoff	zur Analyse	Merck
2	Chloroform (1 % Äthanolzusatz)	zur Analyse	Merck
3	Methylenchlorid 98-100 %	purum, destilliert	Hoechst
4	1,2-Dichloräthan	reinst (Erg. B 6)	Merck
5	Benzol	zur Analyse	Merck
6	Chlorbenzol	reinst	Merck
7	Toluol	zur Analyse	Merck
8	Xylol	f.d.Chromatographie	Merck
9	Dioxan	f.d.Chromatographie	Merck
10	Aceton	zur Analyse	Merck
11	Methyläthylketon	f.d.Chromatographie	Merck
12	Diäthyläther	zur Analyse	Merck
13	Di-iso-propyläther	zur Synthese, dest.	Merck
14	Essigsäureäthylester	zur Analyse	Merck
15	Essigsäure-n-butylester 98-100 %	f.d.Chromatographie	Merck
16	Acetonitril	zur Synthese	Merck
17	Pyridin	purissimum (Erg. B 6)	Merck
18	Methanol	zur Analyse	Merck
19	Äthanol absolut	zur Analyse	Merck
20	1-Propanol	f.d.Chromatographie	Merck

21	Butanol-(1)	f.d.Chromatographie	Merck
22	Isobutanol	f.d.Chromatographie	Merck
23	Amylalkohol	für Analyse und für Chromatographie	Riedel- de Haën
24	n-Hexan	f.d.Chromatographie	Merck
25	Cyclohexan	keine Angabe	Merck
26	Schwefelkohlenstoff	zur Analyse	Merck
27	n-Hexan + Aceton (9 + 1)	f.d.Chromatographie bzw. zur Analyse	Merck

Es handelt sich mit einer einzigen Ausnahme um unäre Systeme, was laut RÄNDERATH für die Reproduzierbarkeit der Rf-Werte vorteilhaft ist.

Herstellung der Platten:

Zur Herstellung der Dünnschichtplatten wurden Glasplatten in der Größe 20 x 20 cm mit einem Streichgerät 21200 der Fa. CAMAG in einer 0,3 mm Schichtdicke des Sorptionsmittels Kieselgel GF₂₅₄ nach STAHL (für die Dünnschichtchromatographie) der Fa. MERCK beschichtet. Die gestrichenen Platten wurden ~20 min an der Luft und anschließend mindestens 60 min im Trockenschrank bei 110° C getrocknet.

Auftragen der Substanzen und Entwicklung der Chromatogramme:

Die Platten werden nach dem Trocknen bei 110° C (es wird hierbei mit Absicht der Ausdruck "Trocknen" anstatt Aktivieren verwendet, da GEISS, SCHLITT und KLOSE nachgewiesen haben, daß jede "Aktivierung" bei hohen Temperaturen

(105° C) zwecklos ist, weil sich die Schicht später mit der relativen Feuchtigkeit der Atmosphäre ins Gleichgewicht setzt. Dabei findet bei mit Al_2O_3 oder SiO_2 beschichteten DSC-Platten eine Umklimatisierung von 15 % auf 80 % relativer Feuchte bereits innerhalb von 1-2 min statt. Zu ähnlichen Ergebnissen für Aluminiumoxidschichten kamen auch HESSE, ENGELHARDT und KOWALIK) aus dem Trockenschrank genommen, vor dem Auftragen der Substanzen auf Zimmertemperatur abgekühlt und dann erst mit den Phosphorestern als 0,1 %ige Lösung in Chloroform p.a. (MERCK) mit einer Micropipette beschickt.

Die Entwicklung der Platten erfolgte in Kammern der Fa. CAMAG, die zur besseren Kammersättigung mit Filterpapier ausgekleidet waren. Die Chromatogramme werden aufsteigend entwickelt.

Sprühreagentien:

NBP-Lösung: 2 g 4-(4-nitrobenzyl)pyridin p.a. (LOBA-Chemie) werden in 100 ml Aceton p.a. (MERCK) gelöst. TÄPA-Lösung: 10 g Tetraäthylenpentamin techn. (ALDRICH) werden mit Aceton p.a. (MERCK) auf 100 ml verdünnt. Morpholin-Lösung: 10 g Morpholin puriss. p.a. (FLUKA) werden mit Aceton p.a. (MERCK) auf 100 ml verdünnt. Der Nachweis der Phosphorsäureester mit NBP, von GETZ und WATTS zuerst in flüssigem Medium entwickelt, ist von WATTS zur Anwendung in der Papier- und Dünnschichtchromatographie modifiziert worden. Statt der TÄPA-Lösung kann man auch eine Morpholin-Lösung verwenden.

Nachweis der Substanzen:

Sprühen mit der NBP-Lösung: in einem Trockenschrank bei 110° C 5 min lang erhitzen und dann mit TÄPA- oder Morpholin-Lösung besprühen. Die Substanzen erscheinen als blaue Flecken auf weißem Hintergrund.

Ergebnis:

Die kleinste noch nachweisbare Menge von DDVP war bei diesem Versuch 0,2 µg und von Dipterex 0,1 µg. Die Rf-Werte sind in der nachfolgenden Tabelle für 17 der 27 Laufmittel angegeben. Auf hRf-Angaben für die Fließmittel Nr. 17 bis 26 wurde verzichtet, da die Phosphorsäureester in n-Hexan und Cyclohexan nicht wandern, die übrigen 8 Laufmittel keine grundsätzlich neuen Trenneffekte bieten und die Alkohole überdies noch eine lange Entwicklungszeit erfordern.

Tabelle 15 hRf-Werte:

Phosphor- säureester	Laufmittel									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DDVP	0	41	20	16	4	2	0	2	74	66
Dipterex	0	3	0	0	0	0	0	0	63	58
Phosphor- säureester	11	12	13	14	15	16	27			
DDVP	65	44	18	61	47	72	-			
Dipterex	51	11	3	35	12	63	-			

Die angegebenen hRf-Werte stellen Mittelwerte aus mindestens 3 Messungen dar. Laufmittel 27 war das einzig verwendete Lösungsmittelgemisch (bereits von ABBOT und THOMSON (1965) zur Trennung von Phosphorsäureestern herangezogen), erbrachte jedoch sowohl für Dipterex als auch für DDVP keine Ergebnisse.

Da die Rf-Werte trotz guter Reproduzierbarkeit gewissen Schwankungen unterliegen, ist es zweckmäßig bei jedem Chromatogramm Vergleichssubstanzen mitlaufen zu lassen.

e) Der Nachweis von Dipterex und DDVP nach GETZ und WHEELER (1968)

Wie bereits erwähnt hat Melwin E. GETZ zusammen mit Helen G. WHEELER den Nachweis von Dipterex und DDVP auf DC - Platten mit dem gleichen Reagensmittel durchgeführt. Sein besonderer Verdienst besteht in der Untersuchung mehrerer Adsorptionsmaterialien. Im Folgenden sei der Versuchsaufbau, die Durchführung und die Ergebnisse nach GETZ angegeben:

Versuchsanordnung:

- a) Dünnschichtausrüstung: DESAGA-BRINKMAN-Applikator und Montierboard (BRINKMAN INSTRUMENTS, Inc. WESTBURY, N.Y.) THOMAS-MITCHEL-Entwicklertanks (Arthur H. THOMAS Co., PHILADELPHIA, Pa.) und 20 x 20 cm Glasplatten.
- b) Adsorbentien: Silic AR^R 4 (MALLINCKRODT); man stelle eine Aufschlammung von 30 g mit 60 ml aqua dest. her. Silic AR^R 7 (MALLINCKRODT); man stelle eine Auf-

schlammung von 30 g in 60 ml Wasser her. Saure Ton-
erde (WOELM): Aufschlammung von 35 g in 60 ml aqua
dest. und Florisil^R 200 Maschen und kleiner (MATHE-
SON, COLEMAN und BELL) Aufschlammung von 35 g in
53 ml aqua dest.

- c) Lösungsmittel redestilliert: Cyclohexan, 2,2,4-Tri-
methylpentan (iso-Octan), Chloroform, Aceton, Aceto-
nitril, Äthylacetat und Isopropyläther (Reagensqua-
lität).
- d) Lösungsmittelsysteme: I Cyclohexan : Aceton : Chloro-
form (70 : 25 : 5) (V/V/V); II 2,2,4-Trimethylpen-
tan : Aceton : Chloroform (70 : 25 : 5); III Aceton :
Isopropyläther : Cyclohexan (40 : 40 : 20); IV 2,2,4-
Trimethylpentan : Äthylacetat : Acetonitril (50 : 20 :
15) und V Cyclohexan : Äthylacetat : Acetonitril
(50 : 20 : 15).
- e) Chromogene Spraymittel: 4(p-Nitrobenzyl)pyridin
(rekristallisiert aus Aceton-Wasserlösung): 2 %ige
Lösung in Aceton.
- f) Standardlösungen: Man bereite Standardlösungen der
Insektizide in Äthylacetat vor.

Vorbereitungen:

Man wiege den erforderlichen Betrag Adsorbens in einem
250 ml Erlenmeyerkolben mit Stöpsel ein, gebe die er-
forderliche Menge Wasser hinzu und schüttle dies 30 sec

lang. Die Aufschlammung gieße man in den Applikator und man belege sechs 20 x 20 cm Platten. Die Schichten lasse man bei Zimmertemperatur trocknen und dann aktiviere man sie 60 min lang bei 100° C. Die aktivierten Platten werden im Desikator gelagert, bis sie gebraucht werden. (Die Länge der Lagerung im Desikator wirkt sich nicht auf den Rf-Wert aus, wie bereits an anderer Stelle schon angegeben).

Versuchsdurchführungen:

Die Standardlösungen werden 2 cm voneinander und 2 cm vom Unterrand der Platte entfernt aufgetragen. Auf den Boden des MITCHEL-Tanks stelle man einen Glastrog oder einen rostfreien Stahltrog, gebe das Lösungsmittel hinzu, appliziere die Platte im Trog und bedecke den Tank mit einer Glasabdeckung; der Tank wird mit einem Band versiegelt. Das Chromatogramm wird nun bei 23° C - 29° C entwickelt, wobei man die Lösungsmittelfront 10 cm weit laufen läßt. Die Platte wird dem Tank entnommen und das Lösungsmittel läßt man vollständig verdampfen. Danach besprühe man die Platte mit der 4(p-Nitrobenzyl)-pyridinlösung und erhitze sie 10 min lang bei 110° C. Schließlich wird sie mit einer Lösung von Tetraäthylpentamin besprüht, woraufhin die Insektizide als blaue Flecken auf weißem Grund erscheinen.

Ergebnisse und Diskussion:

Nachfolgend sind die Rf-Werte angegeben, die man aufgrund mehrerer Versuche unter Verwendung von 5 µg Mengen der 5 Lösungsmittelsysteme und der verschiedenen Adsorbentien erhielt.

Tabelle 16

Rf-Werte für Lösungsmittelsystem I
(Cyclohexan : Aceton : Chloroform 70:25:5)

Nr.	Silic AR 4	Silic AR 7	Aluminiumhydroxid	Florisil
1	0,09	0,10	0,00	0,17
2	0,42	0,38	0,00	0,00

Rf-Werte für Lösungsmittelsystem II
(2,2,4-Trimethylpentan : Aceton : Chloroform 70:25:5)

Nr.	Silic AR 4	Silic AR 7	Aluminiumhydroxid	Florisil
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-

Rf-Werte für Lösungsmittelsystem III
(Aceton : Isopropyläther : Cyclohexan 40:40:20)

Nr.	Silic AR 4	Silic AR 7	Aluminiumhydroxid	Florisil
1	0,72	0,48	1,00	0,67
2	1,00	0,87	1,00	0,00

Rf-Werte für Lösungsmittelsystem IV
(Acetonitril : 2,2,4-Trimethylpentan : Äthylacetat
50:20:15)

Nr.	Silic AR 4	Silic AR 7	Aluminiumhydroxid	Florisil
1	0,26	0,25	0,15	-
2	0,59	0,37	-	-

Rf-Werte für Lösungsmittelsystem V
(Acetonitril : Cyclohexan : Äthylacetat 15:20:15)

Nr.	Silic AR 4	Silic AR 7	Aluminiumhydroxid	Florisil
1	0,77	0,40	0,23	-
2	0,64	0,69	-	-

Dipterex = 1

DDVP = 2

Die Empfindlichkeit mit dem 4(p-Nitrobenzyl)pyridinreagens reichte dabei von 0,5 - 5 µg. Das 4(p-Nitrobenzyl)pyridinreagens kann man als Universalnachweismittel für Organophosphatesterinsektizide betrachten. Die Farbe des Reagensmittels sollte blaß gelb sein; falls irgendeine purpurne Farbe vorhanden ist, sollte das Material rekristallisiert werden. Die Tetraäthylenpentaminlösung sollte keine tiefe Farbe besitzen. Wenn dies doch der Fall ist, dann sollte man den Dekolorisationsschritt mit Holzkohle durchführen. Falls oxydierte Lösungen dieser Reagentien verwendet werden, wird der Hintergrund in hohem Maße entfärbt und die Empfindlichkeit wird um den Faktor 5 verkleinert.

- f) Der Nachweis von Dipterex nach SALO und SALMINEN (1966)

Versuchsdurchführung:

Es wurde eine 0,1 %ige Lösung des Pestizids vorbereitet. Die Präparation der Dünnschichtplatten und die eigentliche Chromatographierung wurde nach der von STAHL stan-

dardisierten Weise vorgenommen. Als Adsorptionsmaterial diente "Kieselgel G für Dünnschichtchromatographie" der Fa. E. MERCK. Die Lösungsmittelsysteme waren a) Benzol : Aceton (1:1) und b) Chloroform. Der Nachweis der Flecken geschah zur Hauptsache mit einer Lösung des Natriumsalzes der 3,5-Dihydroxypyren-8,10-disulfonsäure aber auch mit der Lösung des Natriumsalzes der 3-Hydroxypyren-5,8,10-trisulfonsäure. Die Entwicklungslösung wurde folgendermaßen hergestellt:

10 mg Entwickler werden 100 ml einer Methanol-Wassermischung (8:2) gelöst. Nach dem Besprühen ließ man die Platten kurze Zeit trocknen, worauf sie im UV-Licht betrachtet werden konnten (254 nm).

Ergebnisse:

Tabelle 17 Rf-Werte von Dipterex auf Kieselgelplatten

Lösungsmittel a	Lösungsmittel b
42	02

g) Biochemische Lokalisierung von Dipterex und DDVP nach ACKERMANN (1968)

Diese Methode beruht auf der Hemmung einer Esterase durch die Insektizide und der anschließenden Umsetzung dieser Esterase mit einem geeigneten Substrat. Gegenüber chemischen Nachweisreaktionen besitzt diese Methode eine viel größere Empfindlichkeit.

Versuchsanordnung:

Reagentien: Kieselgel G nach STAHL mit ca. 13 % CaSO_4 (MERCK), mittlere Korngröße 10-40 μg .

Benzol, Aceton, Chloroform destilliert, 0,1 M Natriumthiosulfatlösung.

Enzymlösung: 1 Teil Rinderleber wird mit 9 Teilen dest. Wasser in einem Ganzglashomogenisator nach ELVEHJEM-POTTER homogenisiert und zur Abtrennung der festen Zellbestandteile 5 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Enzymhaltige Überstand wird nochmals 1:4 mit dest. Wasser verdünnt. Die Leber und auch das zentrifugierte Homogenat sind in tiefgefrorenem Zustand mehrere Monate ohne wesentliche Aktivitätsverluste haltbar.

Substratlösung: 4 ml einer Äthanolischen β -Naphthyl-acetatsammlösung mit 125 mg β -Naphthylacetat (Naphtholfrei !) in 100 ml absol. Äthanol werden mit 16 ml einer frisch bereiteten wässrigen Diazinoniumsallzllösung (ca. 20 mg bisdiazodiertes-o-Diamisidin, "Echtblausalz B", "Fast Blue Salt B" in 16 ml dest. Wasser) versetzt. Die Substratlösung muß jeweils unmittelbar vor dem Besprühen hergestellt werden.

Pestizid-
Lösungen: Sie enthalten 1 mg Pestizid/ml Chloroform. Durch Verdünnen mit Chloroform werden die jeweiligen Endkonzentrationen

hergestellt. Die Pestizide werden in reiner Form (Reinheitsgrad 95 und 100 %) verwendet.

Herstellung der
Dünnschicht-
platten:

Die Glasplatten (Fotoplatten 9 x 12 cm) werden mit einem Reinigungsmittel eingeweicht, anschließend in heißem Wasser gewaschen, mit dest. Wasser und Äthanol gespült und getrocknet. Für 4 Platten werden 10 g Kieselgel G mit 20 ml dest. Wasser in einem Porzellanmörser angerührt und in einer Schichtdicke von 250 μ gleichmäßig auf die Glasplatten aufgetragen. Die Platten läßt man über Nacht bei Zimmertemperatur trocknen. Die Verwendung von Pufferlösungen zum Anrühren des Kieselgels hat sich als nicht erforderlich erwiesen.

Fließmittel-
systeme:

Zur Trennung der Pestizide werden als Fließmittel Benzol bzw. Gemische von Benzol-Aceton (19:1, 9:1 und 2:1) verwendet.

Durchführung des enzymatischen Hemmtests:

Nach der Chromatographie und dem Abdunsten der organischen Lösungsmittel werden die Platten sofort bis zum Auftreten einer schwachen Befeuchtung mit der Enzymlösung unter Verwendung von Druckluft gleichmäßig besprüht. Zur Durchführung der Hemmreaktion werden die Platten anschließend 30 bis 60 min in einem feuchtigkeitsgesättigten Brutschrank bei einer Temperatur von 30° C inkubiert. Anschließend

wird, falls erforderlich, nach oberflächlichem Austrocknen der Schicht auf gleiche Weise die Substratlösung aufgesprüht. Nach einigen Minuten färben sich die Platten durch die enzymatische Substratspaltung und Kupplung des dabei entstehenden β -Naphthols mit dem Diazoniumsalz rosa bis rot. Die Inhibitoren werden infolge Ausbleibens der Substratspaltung durch helle Flecken angezeigt. Zur Erzielung einer maximalen Empfindlichkeit muß eine Überdosierung des Enzympräparates, angezeigt durch eine sehr rasche und intensiv blaurote Färbung der Platten, vermieden werden, da zu hohe Enzymkonzentrationen bei sehr kleinen Inhibitormengen nur zu einer teilweisen Enzymhemmung und damit zu einem Ablauf der enzymatischen Substratspaltung auch in Anwesenheit von Inhibitoren führen.

Ergebnisse und Diskussion:

Tabelle 18 Rf-Werte von DDVP und Dipterex in den verschiedenen Laufmittelsystemen

Wirkstoff	Benzol	L a u f m i t t e l		
		Benzol - Aceton		
		19 : 1	9 : 1	2 : 1
DDVP	0,12	0,35	0,56	0,76
Dipterex	0,00	0,05	0,08	0,29

Die nachweisbare Menge betrug dabei für DDVP 0,2 μ g für Dipterex 50 - 100 μ g.

Aktivierung von Dipterex durch Umlagerung zum DDVP:

In neutraler und alkalischer Lösung findet eine Umlagerung des Phosphorsäureesters Dipterex in den Phosphorsäureester DDVP statt. Diese Umwandlung wird in Serum bzw. Organohomogenaten wesentlich beschleunigt, wobei jedoch gleichzeitig eine verstärkte Hydrolyse des gebildeten DDVP zu verzeichnen ist. Aus den Untersuchungen über die Kinematik der Enzymhemmung von DDVP und Dipterex kann geschlossen werden, daß für die Enzymhemmung durch Dipterex die Bildung des DDVP Voraussetzung ist.

Aus diesem Verhalten war zu folgern, daß eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit des Dipterex durch eine beschleunigte Umlagerung in das DDVP zu erzielen sein müßte. Als ein geeignetes Verfahren hat sich das Besprühen der Platte nach der Chromatographie mit einer verdünnten wässrigen Ammoniaklösung (1 Teil konz. Ammoniak + 4 Teile Wasser) oder das kurzfristige Einstellen der leicht angefeuchteten Platte in eine mit Ammoniakdampf gesättigte Kammer erwiesen.

Steigerung der Anti-Enzymaktivität von Dipterex durch wässrige Ammoniaklösung bzw. Ammoniakdampf:

Tabelle 19

Behandlung der Platten mit:

Wässriger Ammoniaklösung		Ammoniakdampf	
Inkubations- dauer (min)	Nachweis- grenze (ng)	Einwirkungs- dauer (min)	Nachweis- grenze (ng)
10	0,5 - 1	0,5	1
20	0,5 - 1	1,0	1
30	1 - 5	2,0	1
-	50 - 100	-	-

Die Einführung dieses Aktivierungsverfahrens für den Phosphorsäureesters Dipterex schafft die Voraussetzungen für einen empfindlichen Nachweis. Die Bestimmung derartig kleiner Mengen macht es möglich, die Aufarbeitung und Reinigung von Extrakten biologischer Materialien pflanzlicher und tierischer Herkunft auf ein Mindestmaß zu beschränken, da Störungen von seiten mitextrahierter natürlicher Stoffe weitgehend ausgeschlossen werden können.

R. ORTLOFF und P. FRANZ (1965) haben eine Methode angegeben, die sich auf die enzymatische Hydrolyse des Indoxylacetats stützt. Das entstehende Indoxyl wird durch den Luftsauerstoff sofort zum Indigoblau weiteroxydiert.

Reagentien:

Serumlösung: 10 %ige wässrige Lösung von Pferdeblut-trockenserum wird 1:1 mit Testol-Standardpuffer pH 8,5

(Feinchemie K.H. KOLLIES K.G., Sebnitz) gemischt. Substratlösung: 0,5 %ige Lösung von Indoxylacetat (Smp. 127° - 128° C) in einer Mischung von 2 Teilen gereinigtem Aceton und 3 Teilen Wasser.

Versuchsdurchführung:

Nach der Entnahme der Platten aus der Trennkammer läßt man sie 5 - 10 min an der Luft liegen. Danach werden sie gleichmäßig mit dem Serumspray befeuchtet und ins Licht einer UV-Lampe gebracht. Nach 1 - 2 Stunden erkennt man die Inhibitoren als dunkle Flecken auf kräftig blaugrün fluoreszierendem Grund. Mit dem allmählichen Rückgang der Fluoreszenz bildet sich dann durch die Luftoxydation des Indoxyls zu Indigo eine blaue Grundfärbung aus, gegen die sich die Inhibitorflecken weiß abheben.

Ergebnisse:

Die erzielbare Empfindlichkeit ist von der während der Inkubationszeit herrschenden Temperatur abhängig. Dieser Faktor wird vor allem bei verkürzter Inkubationszeit wirksam. Ergibt sich zwecks Zeitersparnis die Notwendigkeit die Inkubationszeit auf 5 min zu verkürzen, so ist die Temperierung der Platten im Brutschrank oder dergleichen auf etwa 30° C anzuraten. Die in der folgenden Tabelle angegebenen Nachweisgrenzen bei 5 minütiger Inkubation sind allerdings bei Raumtemperaturen zwischen 20° und 25° C ermittelt worden.

Tabelle 20 Nachweisgrenzen auf Kieselgelplatten
(in μg Substanz)

Substanz	5 min Inkubation		30 min Inkubation	
	Fluoreszenz	Farbe	Fluoreszenz	Farbe
DDVP	0,02	0,05	0,01	0,02
Äthyl- dipterex techn.	5	5	1	2

Diese Methode läßt sich auch mit etwa gleicher Nachweisempfindlichkeit auf Papierchromatogramme übertragen, wobei es hier unbedingt erforderlich ist die Chromatogramme auch bei kurzen Inkubationszeiten in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre aufzubewahren, um das bei Papieren schneller verlaufende Trocknen zu verhindern.

WINTERLIN, WALKER und FRANK (1968) haben 2 Methoden angegeben, die sich auf die Verwendung von Honigbienen-gehirncholinesterase einerseits und Menschenplasmacholinesterase andererseits stützten. Quantitative Ergebnisse konnten mit dieser Methode dadurch erzielt werden, daß man ein Xerox-kopiertes Chromatogramm verwendete und den typischen Fleck, der die Hemmung aufzeigt aus der Xeroxkopie ausschneidet, mit einer analytischen Waage abwägt und die Werte auf halblogarithmisches Papier aufträgt.

Versuchsanordnung:

Die Dünnschichtplatten werden unter Verwendung eines Dünnschichtapplikators (DESAGA-BRINKMAN) mit einer 250 micron Schichtdecke belegt.

Es wurde eine BRINKMAN-Applikationsbox (Modell DB) verwendet, um das Pestizid in einer nitrogenen Umgebung auftragen zu können. Die Applikation des Pestizids ohne die nitrogene Umgebung führte oft zu Kunstprodukten, die nicht von einer Pestizidreaktion unterschieden werden konnten.

Reagenzien:

Adsorbens: Aluminiumoxid G (E. MERCK, Darmstadt, BRINKMAN Instruments, Westbury, N.Y.).

Lösungsmittelsystem: Aceton : Toluol : Hexan : Äthylacetat
2:1:2:1.

Menschenplasma-Indikatorlösung wurde hergestellt indem 1 Teil (der Masse nach) Menschenplasma mit 3 Teilen 0,1 %iger Kresolrot-Indikatorlösung, gelöst in 0,01 N wässriger NaOH, kräftig gemischt wurde. Honigbienenengehirncholinesterase wurde nach einer Modifikation des Verfahrens, das von ARCHER und ZWEIG (1959) angegeben wurde, bereitet. Die Honigbienen (*Apis mellifera*) werden in einem - 30°C Tiefrostbehälter bis zum Gebrauch aufbewahrt. Die Köpfe werden von den Leibern durch 2 US-Standardsiebe mit 6-8 Maschen je Zoll abgetrennt, indem man sie zusammen mit Trockeneis schüttelte. (MOOREFIELD, 1957). 2000 gefrorene Köpfe brachte man in einen Mörser ein und zerrieb sie mit 30 ml einer Salzlösung (8,12 g Manganchlorid und 8,77 g NaCl pro Liter) und 5-10 g gewaschenem Sand. Der Inhalt wurde dann in einen 50 ml Zentrifugentubus mit

zusätzlich 2-5 ml der Salzlösung eingebracht, sodaß es aufging und 10 min bei 10 000 U/min mit einem SSI SORVOLL-Modell einer superschnellen Zentrifuge (IVAN SORVOLL Inc. Norwalk, Conn.) zentrifugiert. Die obenstehende Flüssigkeit wurde in einen graduierten Zylinder dekantiert und die Köpfe wurden erneut mit 30 ml der Salzlösung gemischt und zentrifugiert. Dieses Extraktionsverfahren wurde noch einmal wiederholt und die kombinierten überstehenden Lösungen mit der Salzlösung auf 100 ml ergänzt, sodaß jeder Milliliter den Extrakten von 20 Bienenköpfen äquivalent war.

Die Lösung, die die Bienenhirncholinesterase enthielt, wurde dann in ein Zellophandialyseröhrenmaterial eingebracht und in einen Oxford Vielfachdialysator (Oxford Lab. San Mateo, Calif.) der destilliertes Wasser enthielt, gestellt. Dabei wurde die Temperatur von 4° C genau eingehalten. Das Wasser wurde jeden Tag eine ganze Woche lang durch frisches destilliertes Wasser ersetzt. Zur Vervollständigung der Dialyseperiode wurde die Enzymlösung in 10 ml Glasampullen übertragen und bei -30°C in einem Gefrierautomat bis kurz vor Gebrauch aufbewahrt. Die Bienenhirncholinesterase wurde vorbereitet, indem 1 Teil der Bienenhirncholinesterase mit 3 Teilen Pufferlösung gemischt wurden. (20 g H_3BO_4 pro Liter und 275 ml einer 1 N NaOH, pH-Wert wird, falls nötig, mit NaOH auf $9,7 \pm 0,2$ gebracht.

Eine 0,2 M-Lösung von Acetylcholinbromid wurde für die Menschenplasmacholinesterase vorbereitet. Die Reagenzien, die bei der Vorbereitung des Indophenylacetatsubstrates verwendet werden, müssen unverzüglich angewendet werden, da sie sich gleich zersetzen, wenn man sie

atmosphärischen Bedingungen aussetzt. Man benötigte eine Arbeitslösung von Indophenylacetat der Konzentration 1 mg, wobei Dimethylsulfoxid zugegeben wurde.

Standardlösungen:

100 mg des Pestizids werden abgewogen und mit 100 ml wiederholt destilliertem Chloroform gemischt. Es wurde eine Verdünnungsreihe von 1 - 10 μ l Gehalt an Pestizid aufgestellt.

Versuchsdurchführung:

Die Aluminiumoxidplatten werden gemäß der Methode nach KOVACS (1963) in Anschluß an die Dünnstreifen-DSC-Technik nach BECKMAN und WINTERLIN (1966) vorbereitet. Jeder Streifen ist 15 mm breit, wodurch es möglich ist 10 Streifen pro Platte zu adaptieren. Die Platten werden daraufhin in der Applikationsbox mit einer Nitrogenflut von 150 ml pro Minute übersprüht und mit den Pestizidflecken versehen, indem man eine 10 μ l Spritze verwendet. Die Chromatoplaten sind mit einer Linie 30 mm vom oberen Rand entfernt markiert und werden in die vorgesättigte Entwicklungskammer gestellt, die mit WHATMAN No. 1 Chromatographierpapier ausgeschlagen war. Sobald das Lösungsmittel die vorgemerkte Linie erreicht, werden die Platten entfernt und mit einer Heizpistole 5 min lang getrocknet. Die getrockneten Platten werden nun in einer Schale in horizontaler Lage plaziert und mit der Enzypufferlösung besprüht, bis die Platten vollständig gesättigt sind. Es muß jedoch sorgfältig darauf geachtet werden diesen Punkt nicht zu überschreiten. Die Schale wird zugedeckt und man gewährt den

Platten eine 20 minütige Inkubationszeit bei Zimmertemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Platte mit der Indophenylacetatlösung übersprüht, bis die Oberfläche leicht gelb ist. Nach 10 min erscheinen auf einem ganz intensiv blauen Hintergrund klare, wohl definierte weisse Flecken.

Ein anderes Verfahren zur Anwendung des Substrates kann man sich zunutze machen, indem man einen 8 x 8-Zoll Bogen des WHATMAN No. 1 Chromatographierpapiers sättigt, ihn nämlich in die frische Indophenylacetatlösung eintaucht und ihn am oberen Ende der entwickelten Chromatoplate anbringt. Nachdem die Entwicklungszeit vollständig abgelaufen ist, werden die weissen Flecken mit einem wasserlöslichem Bleistift markiert und das Papier entfernt.

Nachweisverfahren mit Menschenplasma als Cholinesterasequelle:

Die Platten werden mit Menschenplasma und Indikatorlösung besprüht. Nach 20 min wird ein 8 x 8-Zoll Bogen des WHATMAN No. 1 Chromatographierpapiers in eine 0,2 M wässrige Acetylcholinbromidlösung eingetaucht und auf der entwickelten Chromatoplate appliziert. Innerhalb von 15 min waren die Cholinesterasegehemmten Flecken als rote Punkte auf gelbem Hintergrund sichtbar.

Quantitative Analyse:

Genau 10 min nach Applikation des Substrates wurde das Gebiet der teilweise entwickelten Flecken auf dem Dünnschichtchromatogramm mit einem scharfen Gegenstand markiert. Die Platten wurden danach in ein Xeroxkopiergerät

gebracht und man stellte eine Kopie des Chromatogrammes her, das die markierten Flecken aufzeigte. Das Gebiet der markierten Flecken wurde daraufhin ausgeschnitten und auf einer analytischen Waage abgewogen. Das Gewicht des herausgenommenen Papiers, das das gehemmte Gebiet auf dem Chromatogramm darstellte, wurde auf der Logarithmeneinteilung (Abszisse) eines halblogarithmischen Papiers aufgetragen und die Menge des Pestizids in nanogramm Angaben wurde entlang der Lineareinteilung (Ordinate) aufgetragen. Die quantitative Erfassbarkeit hängt erheblich davon ab, wie die Standardbedingungen beschaffen sind. Deshalb müssen die Platten die gleiche Dicke und Konsistenz besitzen und sie müssen gleichartig behandelt werden. Umgebungsbedingungen wie z.B. Feuchtigkeit des Adsorbens, Temperatur, Feuchtigkeit und Zeitaufwand sind alles äußerst sachdienliche Veränderungen und müssen wohlbedacht sein, wenn quantitative Ergebnisse gewünscht werden.

Ergebnis und Diskussion:

Tabelle 21 Nachweisbare Mengen in Nanogramm und
Rf-Wert von Dipterex auf Aluminiumoxid
DSC-Platten

	Menschenplasma- cholinesterase	Bienengehirn- cholinesterase	Rf
Dipterex	2	1	0,03

Eines der Hauptprobleme das charakteristisch für die DSC ist, ist die Veränderung des Rf-Wertes infolge eines Überangebotes eines bestimmten Pestizides. Erfahrungsgemäß zeigte sich, daß die Rf-Werte relativ zuverlässig zu ermitteln waren, wenn die anderen Faktoren konstant sind; wenn die chemische Substanz jedoch in einer Konzentration aufgetragen, die über ihre Entdeckungsgrenze um das 100-fache hinausgeht, kann sich der Rf-Wert signifikant verändern.

2. Papierchromatographie

a) Der Nachweis von Dipterex nach MACRAE und McKINLEY (1961)

Aufgrund der Oxydation zu organischen Phosphaten und der Bildung von Molybdänblau können phosphororganische Insektizide auf Papier nachgewiesen werden. Diese Technik besitzt aber den Nachteil, daß sehr viel Zeit nötig ist, um die stabileren Ester zu hydrolysieren, so daß das Papier nach dem Versuch häufig sehr brüchig war. Übersprühen des Chromatogramms mit N-bromosuccinat und nachfolgend mit Fluoreszin konnte den Nachweis für schwefelhaltige Phosphorinsektizide erbringen. Diese Methode erfordert allerdings sehr sorgfältig abgemessene Reagenzkonzentrationen, sowie ein zweimaliges, aufeinanderfolgendes Übersprühen. Eine andere Möglichkeit zum Nachweis schwefelhaltiger Phosphor-ester auf Papier stellt das Besprühen mit 2,6-dibromo-N-chloro-p-quinonimin in Cyclohexan dar, wobei nachfolgend erhitzt werden muß. Phosphatesterinsektizide,

die keinen Schwefel enthalten, zeigen nach Zugabe dieses Reagenzmittels keine Farbreaktion. FISCHER und OTTERBECK beschrieben den Nachweis von Thiophosphorsäureestern mittels Jodazid.

Im Folgenden soll eine Nachweismethode beschrieben werden, die auf der Fixierung des Ferri-Ions mit der Sulfosalicylsäure beruht. Diese Methode wurde von H.F. MACRAE und W.P. McKINLEY angegeben und basiert auf Beschreibungen von WADE und MORGAN über die Bestimmung von Phosphorsäureestern auf Papier:

Versuchsaufbau:

Chromatographisches
System:

WHATMAN nr. 1 Filterpapierstreifen
8 1/2 x 8 1/2 "

unbewegliche Phase: 8 % V/V Mineral-
öl (BDH) in Äthyläther

bewegliche Phase: Methanol + Wasser
+ 0,5 % NH_4OH ; V/V (19 + 1 + 1 %)

100 % acetyliertes Papier 4 1/2 x 16"
(K. SCHLEICHER und SCHÜLL, DASSEL,
Kreis Einbeck, West-Germany)

unbewegliche Phase: 2 % V/V Mineral-
öl (BDH) in Äthyläther

bewegliche Phase: 70 % V/V wässriges
Aceton. Verdünne 700 ml Aceton zu
1 ml mit Wasser

Standardlösungen: Man bereite Aceton-
lösungen der phosphororganischen In-
sektizide vor, die 2 mg/ml Lösung
enthalten.

Bestimmungsreagenzien: Eisen-III-chloridlösung 0,1 % W/V in 80 % V/V Äthylalkohol. Täglich frische Zubereitung.

Sulfosalicylsäurelösung: - 1 % W/V des BDH-Reagenz in 80 % V/V Äthylalkohol

Bromdämpfe: eine konzentrierte Bromlösung in CCl_4 wird auf den Boden eines großen PYREX-Trockenapparates gestellt.

Geräte: chromatographische Gefäße:

Museumsgefäß ohne Probestützen, A.H. THOMAS Co., PHILADELPHIA 5, Pa.

Zylindrische Gefäße 6 x 18", CANADIAN LABORATORY SUPPLIES Ltd.

Chromatographische Sprühflaschen:

50 ml runder Typ, RESEARCH SPECIALTIES Co., 2005 HOPKINS St., BERKELEY 7, Calif.

Kapillarpipetten: Standardmicroliter-pipetten, die ein Sicherheitspipettenfilter besitzen, PROPIPETTE INSTRUMENTATION ASSOCIATES, 17 WEST 6th St., NEW YORK 23, N.Y.

Versuchsdurchführung:

Die WHATMAN No. 1 - (System A) und die acetylierten (System B) Papierstreifen werden mit einer immobilen Phase imprägniert, indem man die Papierstreifen durch ein kleines Glas-

gefäß zieht, das die passende Konzentration Mineralöl in Äthyläther enthält. Mit dieser Arbeitsweise kann eine gleichmäßigere Imprägnation erzielt werden, als dies mit der Spraytechnik möglich ist. Sämtliche Versuche wurden nach der steigenden Chromatographiemethode durchgeführt. Die einzelnen Proben wurden als Flecken auf eine Linie aufgetragen, die $1\frac{1}{4}$ " vom Unterrand des Papierstreifens entfernt war. Daraufhin wurden die Papierstreifen im Chromatographiergefäß befestigt, wie es von McKINLEY und YASIN angegeben wurde. System A wurde 2 Stunden, System B 3 Stunden entwickelt. Danach ließ man die entwickelten Chromatogramme noch 1 Stunde lang an der Luft trocknen. Von jeder Verbindung nahm man 5 Chromatogramme in beiden chromatographischen Systemen auf. Anschließend wurden die Rf-Werte berechnet und notiert.

Nachweis auf Papierchromatogrammen: Die getrockneten Chromatogramme sprüht man leicht aber gleichmäßig mit einer Eisen-III chloridlösung ein. Danach läßt man die Chromatogramme trocknen und besprüht sie mit der 1 %igen Sulfosalicyllösung. Die Thiophosphate konnten mit dieser Methode nur nach Umwandlung in ihre Sauerstoffanaloga nachgewiesen werden. Man kann dies dadurch erreichen, daß man die Chromatogramme vor dem Auftragen der Nachweisreagenzien mit einer Lösung von Brom in CCl_4 besprüht. Man fand jedoch, daß es einfacher war und daß man zufriedenstellendere Ergebnisse für die Umwandlung dieser Verbindungen auf Papier erzielen konnte, wenn man Brom gesättigte Luft auf die trockenen Chromatogramme einwirken ließ.

Ergebnisse und Diskussion:

WHATMAN Nr. 1 Papier: Nachdem man Bromdämpfe auf die Chromatogramme einwirken ließ und sie mit den Nachweisreagenzien wie oben angegeben besprühte, stellten sich die phosphororganischen Insektizide als weiße Flecken auf einem malvenfarbigen Hintergrund dar. Die Farbe bildet sich jedoch nur aus, wenn das pH der Restfeuchtigkeit auf dem Papier über 1,5 - 2,5 liegt. Unterhalb dieses pH-Bereiches erscheint keine Farbe. Liegt der pH-Wert oberhalb dieses Bereiches, ist die Farbe gelb-orange und der Nachweis der einzelnen Flecken nicht gut. Verbindungen wie TEPP und Phosdrin zeigen die Reaktion auch dann, wenn man keine Bromdämpfe auf das Chromatogramm einwirken läßt. Im Falle des WHATMAN Nr. 1 Papiers bewirken die Bromdämpfe offensichtlich die Oxydation der Thiophosphatester, woraus die Bindung des Eisen-III-ions und die Bildung der weißen Flecken auf einem malvenfarbigen Hintergrund resultiert.

100 % acetyliertes Papier: Die Bromdämpfe lassen die phosphororganischen Insektizide auf dem acetylierten Papier als blaß gelbe Flecken erscheinen, die keine absolute Beständigkeit besitzen. Wenn man das Chromatogramm mit Eisen-III-chlorid besprüht und nachfolgend mit Sulfosalicylsäure, so stellen sich sowohl die Thiophosphate als auch die Phosphatester als weiße Flecken auf malvenfarbigem Hintergrund dar. Wenn das Chromatogramm trocken ist, wird der Hintergrund farblos und die Thiophosphate zeigen sich als intensive gelbe Flecken, während die Phosphatester in diesem Stadium nicht sichtbar sind. Wenn man die Chromatogramme ungefähr 12 Stunden an der Luft stehen läßt, nimmt der Hintergrund wieder die Malvenfarbe an. Die Thiophosphate behalten schließlich ihre intensive

gelbe Färbung, die Phosphatester stellen sich jetzt als weiße Flecken auf dem malvenfarbigen Hintergrund dar. Der Nachweis von Dipterex erfordert hierbei jedoch eine Sonderbehandlung: Dipterex zeigt sich als weißer Fleck auf malvenfarbigem Hintergrund auf den WHATMAN Nr. 1 Papieren erst dann, wenn man 15 min lang Ammoniakdämpfe auf die Chromatogramme einwirken läßt. Es ist anzunehmen, daß Dipterex dadurch teilweise oder ganz in DDVP umgewandelt wird.

Obwohl man noch nicht genau weiß, wie diese Reaktion auf acetyliertem Papier abläuft, erscheint es doch so, daß die Einwirkung der Bromdämpfe bei den Thiophosphaten eher eine Bromierung zur Folge hat als eine Oxydation zu den entsprechenden Phosphatestern, wie es auf gewöhnlichem Filterpapier vor sich geht. Die Eisen-III-chloridlösung intensiviert die von den Thiophosphaten gegebenen gelben Flecken.

Die zugegebene Sulfosalicyllösung schafft die Möglichkeit Thiophosphate und Phosphatester auf ein und demselben Chromatogramm zu unterscheiden. Die Reaktion ist empfindlich genug, um die meisten Verbindungen in einer Konzentration von $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf WHATMAN Nr. 1 Papier nachzuweisen. Auf acetyliertem Papier ist die Reaktion bedeutend empfindlicher. Ein weiterer Vorteil des acetylierten Papiers gegenüber dem gewöhnlichen Filterpapier ist der, daß sich die Lösungen ganz leicht auftragen ließen und daß das Lösungsmittel nicht verstreicht. Daraus resultierten kompaktere Flecken auf den entwickelten Chromatogrammen.

Tabelle 22 Rf-Werte für Dipterex wie sie sich für die
beiden chromatographischen Systeme ergeben

Rf-Dipterex	für System A:	0,78
Rf-Dipterex	für System B:	--

Mit einer gewissen Erfahrung ist es möglich unter Anwendung beider chromatographischer Systeme die meisten Thiophosphate und Phosphatester voneinander zu trennen. Weiterhin wird mit dieser Nachweismethode die Möglichkeit geschaffen, die jeweiligen Verbindungen zu identifizieren, sowie Phosphat- und Thiophosphatester auf gewöhnlichem Filterpapier zu unterscheiden.

Auf aktuelle Rückstandsproben hat man diese Methode jedoch nicht angewendet. Dies würde nämlich einige zusätzliche Kunstgriffe erfordern, wie z.B. die Anwendung geeigneter Extraktions- und Säuberungsmethoden. Die Forschungen über derartige Maßnahmen sind zur Zeit noch im Gange.

b) Biochemisches Verfahren nach COOK (1966)

J.W. COOK führte mit Hilfe der Papierchromatographie Trennversuche durch, wobei er die Hemmwirkung dieser Substanzen auf die Cholinesterase ausnutzte. In einer ersten Arbeit bestimmte er dabei die Verteilung der Hemmsubstanzen auf dem Chromatogramm, indem er die Hemmung der Eluate auf den bestimmten Abschnitten maß, die dabei aus den Chromatogrammen ausgeschnitten werden mußten. Dieses Verfahren ist sehr mühsam, da man eine große Anzahl quantitativer Bestimmungen für jedes Chromatogramm benötigt, um gute

Ergebnisse zu erzielen; aber auch dann sind die Ergebnisse immer noch einigen Ungenauigkeiten ausgesetzt. Da die einzelnen Trenngebiete nicht sichtbar abgegrenzt werden konnten, bestand durchaus die Möglichkeit, daß ein Segment 2 oder mehr Hemmsubstanzen enthält oder daß ein einziger Hemmstoff über zwei oder einen Abschnitt verteilt war.

Um diesen Schwierigkeiten aus dem Weg zu gehen, entwickelte COOK in einer 2. Arbeit ein System, das nachfolgend beschrieben wird. Obgleich man es meist nur zur qualitativen Bestimmung anwendete, so hat sich dieses System doch als höchst nützlich erwiesen schnelle Information zu liefern, was mit anderen Methoden unter diesen Bedingungen äußerst schwierig war. Als quantitative Prüfungsmethode von Doppelchromatogrammaabschnitten besitzt die visuelle Lokation der Hemmsubstanzen ein solches Maß an Zuverlässigkeit, wie sie andere Versuchsweisen nicht leicht erreichen. Zudem konnte die Anzahl der überprüften Abschnitte vermindert werden.

Es ist durchaus nicht ungewöhnlich chromatographierte Enzyme oder auch Enzyme in histologischen Proben in situ durch die Reaktion mit geeigneten Substraten zu lokalisieren. Chromatographierte Substanzen, die als Substrat dienten, konnten aufgrund der Reaktion mit den auf das Papier aufgetragenen Enzymen eindeutig lokalisiert werden. Die Methode nach Cook unterscheidet sich von allen anderen dadurch, daß die Enzymhemmstoffe mittels der gewöhnlichen Cholinesterase-Acetylcholin-Reaktion direkt auf dem Chromatogramm lokalisiert werden können.

Versuchsaufbau:

3 WHATMAN Nr. 1 Papierstreifen von der gleichen Größe wie das Chromatogramm werden zusammen mit dem Chromatogramm übereinandergelegt, wie es folgende Abbildung zeigt:

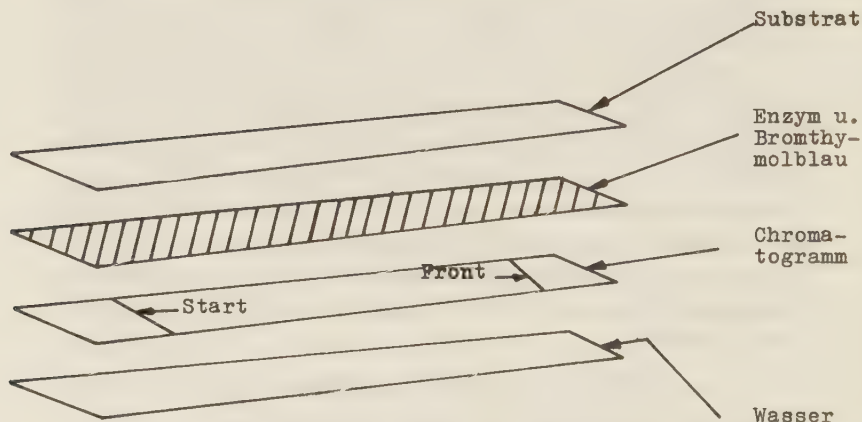


Fig. 1: Anordnung des Chromatogramms und der Reagenzpapierstreifen zur Lokalisierung von in vitro Cholinesterasehemmstoffen auf Papierchromatogrammen nach COOK (1955)

Der unterste Papierstreifen fungiert als Träger von genügend Wasser, um das Chromatogramm gründlich und gleichmäßig mit Wasser zu sättigen. Der 3. Streifen vom unteren Ende aus gesehen, wird, ehe man ihn auf das Chromatogramm legt, gleichmäßig mit dem feuchten Enzympräparat beschich-

tet, das folgende Bestandteile enthält: 1 Teil Menschenblutplasma, 3 Teile Wasser, 0,1 Teil 0,1 N NaOH und 0,25 Teile Indikatorlösung (0,15 g Bromthymolblau in 25 ml 0,1 N NaOH). Nach 5 - 10 min wird der 4. Streifen, den man unmittelbar vorher in die Substratlösung eintaucht, auf den Papierstapel gelegt. Als Substrat dient eine Lösung von 0,10 g Acetylcholinchlorid in 25 ml Wasser. Die mit einer Ätherlösung getränkten Papierstreifen wurden mit einer Reihe phosphororganischer Insektizide beschickt. Die Streifen werden 3 mal mit Mineralöl in Äther (4 + 96) besprüht und mit Wasser als mobile Phase entwickelt. Nach einigen Minuten nehmen die Gebiete, in welchen die Enzymaktivität normal verläuft eine grünlich bis gelbliche Schattierung an, was einem pH-Wechsel als Folge der bei der Reaktion freiwerdenden Essigsäure entspricht. Nach 30 - 40 min sind die Farbänderungen im wesentlichen vollständig abgelaufen. Unveränderte blaue Zonen auf dem gelben Hintergrund geben die Lage der Cholinesterasehemmer auf dem Chromatogramm an. Diese Methode besitzt eine sehr große Empfindlichkeit. Mengen von 0,02 μ konnten noch ohne weiteres nachgewiesen werden.

Es ist jedoch bekannt, daß viele organische Phosphate wie z.B. Parathion in vivo stärkere Hemmer sind als in vitro. DIGGLE, GAGE und Mitarb. (1951) konnten sogar zeigen, daß reines Parathion (d.h. die Thionoverbindung) in vitro überhaupt keine Hemmwirkung entfaltet und daß die Hemmeigenschaften der technischen Produkte nicht der Thionogruppierung, sondern der Anwesenheit anderer Formen zuzuschreiben sind. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es leicht einzusehen, daß sich bei der papierchromatographischen Trennung, die auf der Hemmreaktion basiert, gewisse Schwierigkeiten ergeben können. GIANG und HALL

(1951) geben an, daß man mit Hilfe rauchender Salpetersäure z.B. Parathion zu Paraoxon oxydieren könnte (einem starken in vitro Hemmer). METCALF und MARCH (1953) konnten das Parathion durch Kontakt mit Leber und Insektengewebe in einen starken in vitro Hemmer umwandeln. Oder z. B. konnte OMPA aufgrund der Oxydation durch neutrales Permanganat und durch Reaktion mit Leberstückchen und Pflanzengewebe eine starke in vitro Hemmkraft entfalten.

J.W. COOK machte sich in seiner Ergänzungsarbeit die Wirkungen von N-bromosuccinimid (NBS), Fluoreszin und von ultraviolettem Licht zunutze, um starke in vitro Hemmstoffe zu erhalten.

Versuchsdurchführung:

Je 4 Papierstreifen wurden am Startpunkt mit entweder 2 oder 20 mmg einer wasserfreien Ätherlösung der Insektizide beschickt (Dipterex 2 mmg). Die Streifen A und B wurden unmittelbar danach mit einer Lösung von USP-Mineralöl in wasserfreiem Äther (4 + 96) besprüht und mit Wasser als mobiler Phase, wie bereits angegeben wurde, entwickelt und dann bei Raumtemperatur zum Trocknen aufgehängt. Die B-Streifen besprühte man danach mit einer Lösung von NBS in Methylchloroform (0,09 g von NBS in 50 ml gewaschenem Methylchloroform und auf 1 + 4 mit gewaschenem Methylchloroform verdünnt). Die Streifen ließ man nun ~ 1 - 2 Stunden hängen, um Säureunterschiede auszuschalten (vermutlich HBr, was aus NBS neugebildet wird). Danach überprüfte man beide Streifen in gleicher Weise auf in vitro ChE-Hemmer wie vorher angegeben.

Die C-Streifen beschickte man genau so wie A und B mit den Insektiziden, jedoch besprühte man sie an der Startlinie mit NBS, ehe sie mit Öl behandelt und chromatographiert wurden. Deshalb unterscheiden sie sich von den B-Streifen nur dadurch, daß die Verbindungen, die sich im Anschluß an die NBS-Behandlung bildeten, während der Entwicklung des Chromatogrammes wanderten. Die Lagebestimmung der Hemmsubstanzen erfolgte auf die gleiche Weise wie für die Streifen A und B. Die D-Streifen beschickte man genauso wie die Streifen A, B und C, jedoch bestrahlte man sie 45 min lang mit einem starken UV-Licht (GENERAL ELECTRIC Co. UVIARC) ehe man sie mit Öl behandelte und chromatographierte. Die UV-Bestrahlung vor der eigentlichen Chromatographie hatte die Ausbildung von Verbindungen zur Folge, die während der Entwicklung des Chromatogramms wanderten.

Ergebnisse und Diskussion:

Die mit A bezeichneten Streifen sind im allgemeinen mit den Streifen der ersten Untersuchungsarbeit identisch. Die B-Streifen zeigen jedoch in allen Fällen an der Startlinie eine größere Hemmung als die A-Streifen, was darauf hinweist, daß sich durch die Reaktion mit NBS aus Substanzen mit geringer in vitro Hemmkraft starke in vitro ChE-Hemmer gebildet haben. Außer im Bereich der Startlinie zeigen die Streifen A und B in den anderen Abschnitten des Chromatogramms keine große Änderung. Eine Ausnahme davon bildet OMPA, das infolge seiner Löslichkeit geschlossen zur Front wanderte und dort von NBS in einen starken in vitro Hemmstoff umgewandelt wurde. Etwas von der OMPA-Menge blieb jedoch auch im Start lie-

gen und wurde hier durch das NBS in seiner Hemmwirkung verstärkt. Die D-Streifen (UV bestrahlt) zeigen ein ähnliches Bild wie die C-Streifen, wobei auf letzteren Verbindungen entstanden, die nach Rf 3 - 4 oder Rf 8 - 9 wanderten. Im Falle der D-Streifen findet die Hemmung immer in Position 8 - 9 statt und die Flecken sind deutlicher ausgeprägt. Aus den Beispielen Diazinon und Sulfotepp kann man erkennen, daß die Flecken auf den D-Streifen eine zu große Hemmung aufzeigen um ein gutes Ergebnis zu liefern. Kleinere Mengen der Muttersubstanz würden hier bessere Ergebnisse erzielen. Die NBS-Behandlung läßt im allgemeinen mit Ausnahme von Dipterex Substanzen entstehen, die wasserlöslicher sind als die Grundsubstanzen. Die UV-Bestrahlung scheint sich in ähnlicher Weise auf die Wasserlöslichkeit auszuwirken. Die UV-Wellenlängen liegen dabei im Bereich von 300-400 m μ .

c) Der Nachweis von Dipterex nach MITCHEL (1961)

L.C. MITCHEL befaßte sich intensiv mit der Wirkung von ultraviolettem Licht (2537 Å) auf Pestizide auf Papierchromatogrammen. Verschiedene Lichtstrahlen, gewisse Chromogenagentien, oder beides zusammen, dienten dabei als Nachweismittel. Die verschiedenen Lichteinstrahlungen bestanden aus Tageslicht, langwelligem UV-Licht 3600 Å (sog. schwarzes Licht), kurzwelligem UV-Licht 2537 Å (sog. Minerallicht) und die Chromogenagentien waren wie folgt:

Beräucherung mit Bromdämpfen, Übersprühen mit einer Äthanollösung von Fluoreszin, sowie Betrachtung unter

verschiedener Lichtbestrahlung und die Übersprühung mit einer Acetonlösung von Silbernitrat und 2-Phenoxyäthanol.

Versuchsaufbau:

Chromatographiertank und Zubehör

(A.H. THOMAS Co., Cat. No. 3106-F05 oder gleichwertiges)

Tauchbehälter und Zubehör

(A.H. THOMAS Co., Cat. No. 3106 H50 oder gleichwertiges)

Template - Vor der Extraktion mit organischen Lösungsmitteln, vor dem Waschen oder dem Auftragen der Flecken zur Markierung von 8 x 8" Filterpapier verwendet

Soxhlet-Apparat -

(SCIENTIFIC GLAS APPARATUS Co., Cat. No. J.E.-5700, Größe G mit Hitzemantel Cat. No. H-1830, Größe M-112 oder gleichwertiges) wird dazu verwendet 8 x 8" Bögen WHATMAN Nr. 1 Filterpapier mit 95 % Äthanol vor dem Waschen mit destilliertem Wasser zu durchtränken.

Rostfreier Trichter mit Zubehör zum Waschen der Äthanolgetränkten Papiere mit aqua dest. verwendet. Die Papiere sollten vor dem Papierchromatographieverfahren getränkt und gewaschen werden, um wenigstens teilweise die Substanzen zu entfernen, die mit den Chromatogenagentien interferieren können.

UV-Lampen - Chromato-Vne, ausgestattet mit UV-Lampen; Model XX - 15 C (Langwelle 3660 Å) und C - 81 (Kurz-
welle 2537 Å)

(BLACK LIGHT EASTERN CORP!, BAYSIDE 61, LONG ISLAND, N.Y. Model C-3, oder gleichwertiges)

Chromatographie Papier - WHATMAN Nr. 1 Filterpapier zu chromatographischen Zwecken 8 x 8" Bögen.

Achtung: Die Chromatographierbögen dürfen nicht mit bloßen Händen angefaßt werden, solange das Chromatogramm noch nicht vollständig entwickelt ist. Man benutze reine Baumwoll- oder Gummihandschuhe. Die Filterpapiere werden wie folgt getränkt und gewaschen:

Unter Verwendung eines harten Stiftes und des Templates mit 9 Auszackungen zeichne man die Startlinie 1" vom Unterrand des Bogens entfernt ein, indem man mit der ersten Auszackung beginnt die 1" von einer der beiden Ecken entfernt ist. Daraufhin rolle man den Papierbogen zu einem festen Zylinder zusammen und führe den Zylinder in die Trockenröhre des Soxhletapparates ein. Dann wird genügend viel 95 % Äthanol zugegeben und man tränke ihn kontinuierlich 24 - 26 Stunden lang. Das überschüssige Äthanol läßt man aus der Röhre ablaufen und überträgt die getränkten Papiere auf eine 9 x 9" rostfreie Stahlplatte (Zusatz zu den Metalltrichtern). Man bedecke die Papiere mit einer 2. Stahlplatte und presse sie fest zusammen um das überschüssige Äthanol zu entfernen und lasse sie über Nacht bei 100° C in einem Heißluftofen trocknen, um das Äthanol zu entfernen. Die getrockneten Papiere werden in einen rostfreien Metalltrichter gegeben, der Trichter mit aqua dest. gefüllt und die Papiere werden mit einem sauberen Becher etwas angepreßt, um die eingefangene Luft abzudrücken. Der Trichter wird dann gelegentlich hin- und hergeschwenkt, um die abgedichteten Papiere zu lockern. Daraufhin läßt man ihn eine Stunde lang stehen und trocknen. Dieser Arbeitsgang wird 2 Tage lang wiederholt und der Trichter wird für die dazwischenliegende Nacht mit Wasser gefüllt. Man bedecke den Trichter mit einer 9 x 8" rostfreien Stahlplatte und

drehe ihn um, dann zentriere man das Papier auf die Metalloberfläche und presse es ganz fest, um das überschüssige Wasser zu entfernen. Daraufhin gebe man das Papier in einen Ofen, am besten in einen Heißluftofen bei 100°C bis es trocken ist (das erfordert mehrere Tage). Man lasse das Papier abkühlen und verwahre es in einem sauberen Behälter (der Pappkarton in dem man die Papiere erhielt, ist ausreichend). Vor Gebrauch müssen die Papiere auf die atmosphärischen Bedingungen angepaßt werden.

Blaudruckpapier -

DIETZGEN, mittel extra, beschichtet mit kolloidalem Silica; Cat. No. 213, Rolle 36", Länge: 10 yards; Geschwindigkeit HL.

Chromogenagentien -

Brom, A.C.S. Qualität; man löse und verdünne 0,25 g Fluoreszin auf 100 ml mit N,N-dimethyl-formamid, DMF/Industriequalität
(MATHESON, COLEMAN and BELL DIVISION, The MATHESON Co., Inc., oder gleichwertiges)

(Vorratslösung) verdünne 2 ml auf 200 ml mit 95 % Äthanol (Spraylösung)

Man löse 1,7 g AgNO_3 in 5 ml H_2O , gebe 20 ml 2-Phenoxyäthanol hinzu

(EASTMAN ORGANIC CHEMICALS No. P 4861 oder gleichwertiges)

Man verdünne dies mit Aceton (analytische Qualität) auf 200, gebe 1 Tropfen 30 %iges Hydrogenperoxyd hinzu und mische. Man lasse es über Nacht stehen oder länger, bevor es in den Spraykolben oder die Flasche gegeben wird.

Standardlösungen -

Lösungen der Pestizide: Lösung A: Man löse und verdünne 0,1 g festes oder klebriges Pestizid, oder 0,1 ml flüssiges Pestizid (der Einfachheit halber wird versichert, daß 0,1 ml flüssiges Pestizid 0,1 g wiegen) mit Äthyläther auf 0,10 ml (man verwende dabei getrennte 10 ml Kolben für jedes Pestizid)

Lösungen B, C, D: Zur Vorbereitung der Lösungen die 5 mmg (B), 2 mmg (C) oder 1 mmg (D) der Pestizide in 0,001 ml enthalten, verdünne man 1 ml Lösung A des jeweiligen Pestizids mit je 1,4 oder 9 ml Äthylacetat und mische es.

Lösungsmittelsysteme -

Wässrige: (1) Immobiler Phase: man verdünne 25 ml USP-schweres Mineralöl auf 500 ml mit Äthyläther ASC-Qualität und mische es. (2) Mobile Phase: man verdünne 50 ml DMF auf 100 ml mit H_2O und mische es.

Nicht wässrige: (1) Immobiler Phase: Verdünne 150 ml DMF auf 500 ml Äthyläther und mische es. (2) Mobile Phase: 2,2,4-trimethylpentan, reine Qualität (99 Mole % Minimum)

PHILIPS PETROLEUM Co., BARTLESVILLE, Okla., oder gleichwertiges).

Versuchsdurchführung:

Um ein bequemes übersichtliches Identifizierungssystem zu bekommen, gebe man mit einem Hartstift die Zeichen O, X, O, X (Blindprobe) O, X, O, X unter den 9 Auszackungen der Startlinie der Papiere an, um die Gruppe zur Linken des ersten Pestizids anhand der 4 Markierung

gen und die Vierergruppe zur Rechten des 2. Pestizids identifizieren zu können. Die Papierbögen werden dann nahe an der oberen Ecke von 1 - 8 jeweils mit Datum durchbeziffert. Man trage nun 0,001 ml (1 microliter) Portionen der Lösung A des ersten Pestizids auf den mit "X" bezeichneten Punkten der linken Gruppe aller Papiere auf und Lösung A des 2. Pestizids auf den "X" Punkten der rechten Gruppe. Die Frontseite aller 8 Papiere bestrahle man 30 min lang mit Germicidallight, dann wird die Rückseite 30 min lang bestrahlt. Die bestrahlten Papiere werden danach aus dem Germicidallight entfernt und die O-Marken werden mit 0,001 ml Portionen beschickt. Alle 8 Papiere enthalten so auf Duplikatflecken die 2 Pestizide und zwar so, daß 1 Fleck jedes Paares dem Licht nicht ausgesetztes Material enthielt, wohingegen die Substanz des anderen dem Licht ausgesetzt war.

Wässriges System - mit einem Glastrichter fülle man den Tauchtank bis auf 1/8" bis zum Rand mit dem immobilisierenden Lösungsmittel (5 % V/V Mineralöl in Äthyläther gelöst) und schließe ihn. An der Bodenecke des Papiers Nr. 1 hefte man eine 2" Binderklammer an, drehe das Papier um, entferne den Deckel vom Tauchtank und tauche das Papier hinein, bis das Lösungsmittel die Startlinie berührt, daraufhin entferne man das Papier unverzüglich, verschließe den Tank und befestige die obere Ecke des Papiers an einem Glasstab am Deckel.

Den Tauchvorgang wiederhole man für das Papier Nr. 2. Sobald die beiden Papiere am Glasstab des Deckels befestigt sind, gebe man 50 ml des mobilen Lösungsmittels (50 ml, V/V, DMF mit Wasser auf 100 ml verdünnt) zu

jedem Trog in dem Chromatographiertank hinzu. Die Papiere hefte man nun an getrennte Glasstäbe und bringe sie gleichzeitig in den Chromatographiertank, schließe und versiegle ihn mit Cellophan oder mit Maskenband (1" breit). Der Vorgang wird für die Papiere 3 und 4 wiederholt. Die Entwicklungszeit liegt bei 2 1/4 Stunden. Sobald der Tauchvorgang völlig abgeschlossen ist, lasse man das Lösungsmittel aus dem Tropftank in einen Kolben mit Glasstopfen mit Hilfe eines Glassiphon ablaufen (man soll es nicht ausschütten !). Der Tank und der Siphon werden gesäubert und getrocknet.

Nicht wässriges System - Man gebe 50 ml des mobilen Lösungsmittels 2,2,4-trimethylpentan zu jedem Trog im Chromatographiertank und verschließe ihn. Wie oben beschrieben fülle man den Tropftank auf 1/8" Entfernung zum Rand mit dem immobilisierten Lösungsmittel (150 ml DMF verdünnt auf 500 ml mit Äthyläther) und tauche die Papiere 5 und 6 ein. Dabei werden die Papiere 5 und 6 an getrennte Glasstäbe geheftet und der Chromatographiertank wird offen gelassen. Die Papiere werden daraufhin gleichzeitig in den Tank eingebracht, dieser wird verschlossen und versiegelt. Der Vorgang wird für die Papiere 7 und 8 wiederholt. Die Papiere tauche und übertrage man so schnell wie möglich. die Entwicklungszeit beträgt ~ 1 1/4 Stunden. Man lasse den Überschuß aus dem Tauchtank und dem Siphon abtropfen, säubere und trockne sie.

Die Tanks lasse man solange stehen, bis die jeweiligen Lösungsmittelfronten bis auf 0,5" Entfernung vom Oberrand der Papiere herangewandert sind. Dann erbreche man das Siegel, öffne den Deckel, entferne ein Chromatogramm und verschließe den Tank. Man übertrage das Papier vom

Glasstab, der im Tank verwendet wurde auf einen Glasstab im Deckel. Dieser Vorgang wird für das 2. Papier wiederholt und man lasse die Papiere so lange hängen, bis sie trocken sind (~ 1 Stunde). Während die Papiere trocknen entferne man die Lösungsmittel aus den Trögen mit Hilfe einer 50 oder 100 ml Pipette und mechanischer Absaugung (niemals mit dem Mund !), dann säubere und trockne man die Tröge.

Nachdem die Chromatogramme trocken sind, behandle man sie wie folgt:

Man betrachte die Chromatogramme unter den verschiedenen Lichtstrahlen: mit einem weichen Bleistift werden jegliche Flecken oder Streifen und/oder irgendwelche ausgelöschten oder im UV-Licht fluoreszierende Gebiete markiert. Die R_f -Werte werden notiert. Die Papiere 2 und 6 sind blau gedruckt. (Man benutze einen dunklen Raum und beschränke die Lichtstrahlung auf ein Minimum.) Die 9x9 Papiere sind von der Rolle blau gedruckten Papiers abgeschnitten: man messe 9" Breite ab, falte den Streifen über das Papier zurück, bis zu den äußeren Enden des Streifens und rolle ihn zusammen, falte ihn fest und schneide ihn mit einem Dünnschaber, der unter einem Winkel von 45° gehalten wird ab. So erhält man einen 9x36" Streifen von einheitlicher Breite. Man falte den Streifen so, daß die Enden eben sind und schneide 9" mit einer Papierschere ab und schließlich schneide man 9" von dem verbleibenden 9x18" Streifen ab. So erhält man vier 9"-Quadrate zum Blaudrucken der Chromatogramme. Um die Bögen vor dem Aufrollen zu bewahren, bedecke man die Quadrate mit einem Buch oder einem ähnlichen Gewichtsstück. Man lege ein Chromatogramm, Frontseite nach oben, auf die empfindlich gemachte Seite des 9x9" Blaupapiers

so, daß die oberen Ecken beider Papiere zusammenfallen. Die oberen Ecken werden mit kleinen Nr. 2 Papierklammern zusammengeheftet. Man schneide nun mit einer Papierschere den unteren Rand des Blaupapiers ab, bis es die gleiche Länge wie das Chromatogramm besitzt und hefte danach auch die unteren Ecken zusammen. Zur Identifizierung des Chromatogramms beschrifte man das Blaupapier auf der Rückseite nahe der oberen Ecke und glätte es mit den Fingern, sodaß die beiden Papiere ganz dicht beisammenliegen. Man appliziere das Papier auf die saubere Glasoberfläche unterhalb der Germicidallampe und lege Glasstücke von 8 x 1" Ausdehnung (oder eine ähnliche Größe) auf die entgegengesetzten Ecken des überlappenden Blaupapiers, um die Papiere in flacher Lage zu halten. Danach bestrahle man die Papiere 25 min mit der Germicidallampe (die optimale Zeit sollte vom Experimentator bestimmt werden). Danach trenne man die Papiere und wasche das Blaupapier in kaltem Wasser, wobei man es immer wieder in ein gefülltes Waschbecken eintaucht oder indem man es unter einen Wasserhahn hält bis die Flecken völlig definiert sind. Das Papier wird dann auf einer glatten Oberfläche getrocknet oder man klammere es an einen Glasstab am Deckel an. Nachdem das Blaupapier trocken ist, schneide man es mit der Schere auf eine Größe zu, sodaß es vom Chromatogramm bedeckt wird. Falls das Blaupapier sich einrollt, mache man es eben, indem man es in umgekehrter Richtung einrollt oder man lege es über Nacht unter ein Gewicht.

Papiere 3 und 7: Eine kleine Menge Brom wird in ein Gallonglas mit großer Öffnung abpipettiert oder in einen anderen geeichten Glasbehälter und man verschließe es (1 ml Bromdampf für 16 - 20 Chromatogramme). Man rolle das

Chromatogramm zu einem Zylinder zusammen, öffne den Glasbehälter und entferne das Papier mit einer Zange, schließe den Glasbehälter und hefte das Papier an eine Glasstange am Deckel und innerhalb von 30 sec besprühe man es mit verdünntem Fluoreszin. Innerhalb von 3 - 5 min betrachte man das Papier unter UV-Bestrahlung und umfahre die Flecken oder Streifen mit einem weichen Stift. Dieses Verfahren wird für das Papier Nr. 7 wiederholt.

Das Brom verwandelt Fluoreszin in Eosin und läßt das Papier bei Tageslicht rosa erscheinen. Unter UV-Licht erscheinen die Pestizide gewöhnlich als satte Gebiete (tief dunkelblau manchmal schwarz) oder manchmal als fluoreszierendes Gebiet auf einem grünlichgelben (wässrigen System) bis hellgelben (nicht wässriges System) Hintergrund.

Falls das Brom das Fluoreszin nicht in Eosin verwandelt, entsteht so gut wie kein Kontrasthintergrund und die Flecken können "maskiert" oder obliteriert sein. Neutrales Fluoreszin arbeitet besser als alkalische (NaOH) oder saure (HCl) Lösungen.

Papiere 4 und 8: Man besprühe die Chromatogramme mit dem Silbernitrat + 2-Phenoxyäthanol Chromogenagens und setze sie gleich der Germicidalbestrahlung aus, zuerst die eine Seite, dann die andere, so lange, bis die Flecken völlig definiert sind. Die Chromatogramme werden wie folgt gewaschen, um das überschüssige Silbernitrat zu entfernen: man hänge den Glasstab mit dem Papier über ein Waschbecken, einen Tiegel oder Trog und befeuchte das Papier sorgfältig mit einem leichten Streifen Wasser aus einer Waschflasche, vorzugsweise verwendet man Luftdruck für den Kolben und fahre mit der Waschung fort, indem man das Papier vor- und zurückbewegt. Man lasse das Wasser

unter einem Winkel von 35° - 80° einstrahlen, bis das Papier gleichmäßig gewaschen ist. (~ 500 ml H_2O .) Man lasse die Chromatogramme über Nacht trocknen, ehe man sie aufstapelt. Die Chromatogramme können dadurch zerstört werden, daß sich die Flecken von einem Papier auf das andere übertragen, wenn man sie zu bald aufstapelt.

Ergebnisse und Diskussion:

Wenn man 10 mmg eines Pestizids auf Filterpapier aufträgt und wenn der Fleck dem Germicidallicht unter den beschriebenen Bedingungen ausgesetzt wird, kann das Licht eine von drei Wirkungen zeigen:

1. es verursacht wenig oder keine Umwandlung im Pestizid
2. es bewirkt praktisch einen völligen Zerfall des Pestizids, oder
3. es bewirkt Veränderungen im Pestizid, die zwischen diesen beiden Extremen liegen.\

Im Falle von Dipterex ergab sich, daß das Germicidallicht nur wenig oder keine Umwandlung bewirkte. Für DDVP hingegen konnte man mit diesem doch recht aufwendigen Verfahren keine erfolgreiche Trennung erreichen, da sich sowohl das Lösungsmittelsystem, als auch das Chromogenagens als ungeeignet erwies. Es ergaben sich daher nur unbefriedigende Flecken. Nachfolgend seien die chromatographischen Daten angegeben:

Dabei bedeuten:

- B = Blaudruck
- F = Brom + Fluoreszin
- A = Silbernitrat + 2-Phenoxyäthanol
- T = Tageslicht
- L = Langwellen UV
- K = Kurzwellen UV

Die Rf-Werte sind Durchschnittswerte aus 2 Ergebnissen:

Tabelle 23 Dipterex, wässriges System 21° C

mit Germicidallicht nicht bestrahlt							- bestrahlt							
Chroma- togramm Nr.	Nachweis			durch			Rf	Nachweis			durch			Rf
	Licht			Agens				Licht			Agens			
	T	L	K	B	F	A		T	L	K	B	F	A	
1	-	-	-					-	-	-				
2				-	-						-	-		
3				-	-						-	-		
4						+	0,96						+	0,96

3. Colorimetrisches Verfahren (Farbreaktion nach SCHÖNE- MANN) nach LOHS und DONNER (1966)

Zum Nachweis einer großen Zahl organischer Phosphorsäureester eignet sich die 1944 von SCHÖNEMANN aufgefundene und nach 1945 in den USA und England näher aufgeklärte Reaktion der Phosphorsäureester mit Peroxid-Amin-Kombinationen. Durch intermediäre Bildung einer organischen Perphosphor- bzw. Perphosphonsäure wird das betreffende Amin in einen chinoiden Farbstoff überführt der kolorimetrisch bestimmt werden kann. (Persäurebeweis durch Bildung von 1 Mol Sauerstoff und Verbrauch von 2 Mol Peroxid pro Mol Phosphorsäureester in Abwesenheit des Amins.) Als Peroxide kommen für diese SCHÖNEMANN-Reaktion gepufferte, alkalische Wasserstoffperoxidlösungen, Natriumperborat, Natriumpyrophosphatperoxid, Harnstoffperoxid (gepuffert mit Natriumcitrat) in Frage. Als Amine verwendete man Benzidin oder o-Tolidin (gelbe Färbung). Wichtig für die analytische Ausbeute dieser Reaktion ist die Einhaltung eines optimalen pH-Wertes zwischen 9,5 und 10,5, da in saurer Lösung die Reaktion zwischen Phosphorsäureester und Peroxid sehr langsam verläuft und im alkalischen Medium oberhalb pH 12 die durch Peroxid katalysierte Hydrolysegeschwindigkeit der meisten Phosphorsäureester nahezu linear mit dem pH-Wert ansteigt, sodaß das Farbmaximum nicht erreicht wird. Als Störsubstanzen wirken Aldehyde und alle zur Persäurebildung geeigneten Verbindungen (deshalb peinlichste Reinigung solcher Lösungsmittel wie Aceton, Alkohol usw.), ferner stören Kupfer-, Molybdän-, Eisen-, und Mangansalze, die aus der Reaktion durch Zusatz geeigneter Komplexbildner wie Natriumhexametaphosphat ausgeschaltet werden können und schließlich

stören, Reduktionsmittel (wie z.B. Thiosulfat) und Oxydationsmittel. Zahlreiche anorganische und organische Säurechloride und Anhydride (z.B. PCl_3 , PoCl_3 , $\text{CH}_3\text{-PoCl}_2$, Benzoylchlorid, Phtalsäureanhydrid) stören, da sie die gleiche Reaktion wie die P-ester geben.

Versuchs-anordnung:

2,5 % Benzidin-Acetonlösung

0,25 % Na-Perboratlösung, frisch zubereitet

Vorratslösung: Mengen von 1 - 20 μg Dipterex (techn. Qualität) und DDVP (techn. Qualität) wurden in 1 ml Isopropylalkohol gelöst.

Versuchsdurchführung:

Die Standardkurve erhielt man wie folgt: Man pipettiere 2 ml der Vorratslösung in ein Teströhrchen ab und gebe 0,5 ml 2,5 % Benzidinacetonlösung und 2 ml 0,25 % Na-Perboratlösung hinzu. Nach gutem Durchmischen lasse man es 20 min lang stehen. Es entwickelt sich eine gelborange Farbe. Man messe die Absorption der gefärbten Lösung photometrisch gegen eine Blindprobe.

Ergebnisse und Diskussion:

Die Absorptionskurven sind nachfolgend angegeben und die maximale Absorption lag bei 420 m μ sowohl für Dipterex als auch für DDVP. Ebenso sind die Standardkurven für gereinigtes Dipterex und DDVP für den gesamten Bereich von 2 - 40 μg angegeben.

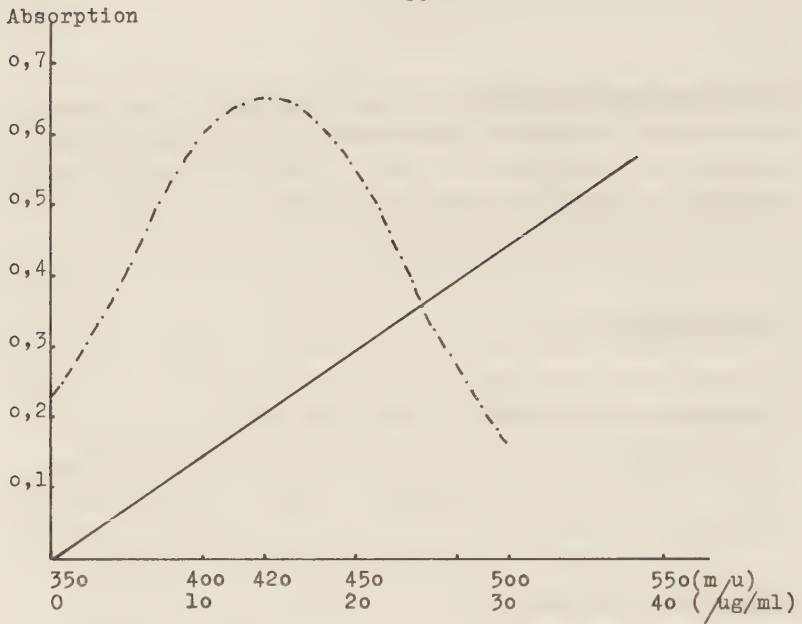


Fig. 2: Absorptionswellenlängenkurve und Standardkurve von Dipterex für die Benzidinmethode nach YAMASHITA (1961)

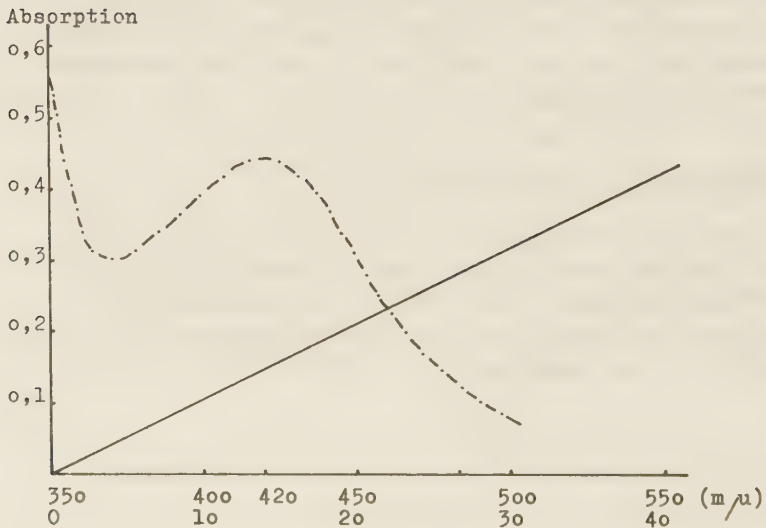


Fig. 3: Absorptionswellenlängenkurve und Standardkurve von DDVP für die Benzidinmethode nach YAMASHITA (1961)

Man hat diese Methode auch auf andere phosphororganische Verbindungen, Gifte und Medikamente angewendet:

Phosphororganische Verbindungen wie z.B. TEPP, HETP, Paraoxon, Parathion, Diazinon, Phosdrin, DOW-ET-14 und Methylparathion reagierten auf diesen Test empfindlich; Malathion, Pestox-3, Gusathion und Systox oder Metasystox jedoch nicht. Anorganische Phosphorverbindungen, Arsenate, Silikate, Arzneimittel wie z.B. Morphin, Codein, Cocain, Barbitol und Chloralhydrat und die Insektizidverbindungen BHC und DDT reagierten auf diesen Test meist negativ und konnten deshalb deutlich von den phosphororganischen Verbindungen unterschieden werden.

II. Nachweis von Spaltstücken und Molekülstücken

1. Phosphornachweis mit HANES-ISHERWOOD-Reagens nach YAMASHITA (1961)

Für einen einfachen Nachweis des Phosphors in Organophosphorverbindungen verwendete YAMASHITA "HANES-ISHERWOOD-Reagens (1949) (6 m Perchlorsäure, 25 ml von 4 % Ammoniummolybdat, 10 ml 1 N HCl + 60 ml aqua dest.) bei einem Tröpfchenversuch ("spot-test") auf Filterpapier.

Das phosphororganische Dipterex (50 % Emulsion) und DDVP (36,5 % Emulsion) wurden mit dem aqua dest. verdünnt und dem Test unterzogen. HANES-ISHERWOOD-Reagens wurde auf das Filterpapier gesprüht, das

einen Tropfen der Probe enthielt. Anschließend erhitzte man es auf 80°C und bestrahlte es mit UV-Strahlen oder Sonnenlicht, wodurch sich der Phosphorfleck blau färbte. Dabei war Dipterex noch in 500-facher, DDVP noch in 200-facher Verdünnung nachzuweisen. Jedoch ist dieser Test nicht nur für phosphororganische Verbindungen positiv, sondern auch für anorganische Phosphorverbindungen, Arsenate und Silikate.

2. Qualitativer Chlornachweis nach YAMASHITA (1961)

Man gibt einige Tropfen einiger 85 %igen Silbernitratalkohollösung und einer 37 %igen Formaldehydlösung auf ein Filterpapier, das die Flecken der Probe enthält. Wenn das Filterpapier wieder trocken ist, gibt man einen Tropfen N-Kaliumhydroxid-methanolllösung zu den Flecken hinzu und anschließend eine Mischung von salpetersaurer Säure und 30 % Hydrogenperoxid (gleiches Verhältnis !). Wenn man das Filterpapier mit UV-Licht oder Sonnenlicht bestrahlt, erscheint ein purpurroter Fleck.

Dipterex, DDVP, DOW-ET-14, Chlorthion reagieren auf diesen Test positiv, die anderen phosphororganischen Verbindungen zeigen eine negative Reaktion. Dipterex und DDVP können mit diesem Test noch bei 100-facher Verdünnung nachgewiesen werden.

3. Quantitativer Chlornachweis nach BENNEWITZ und FOTH
(1967)

Zur chemischen Bestimmung des Wirkstoffgehaltes in technischen Wirkstoffen und Formulierungen ist für Dipterex eine Standardmethode der World Health Organization (WHO-Methode) bekannt, die darauf beruht, daß der Wirkstoff bei Einwirkung von Monoäthanolamin unter bestimmten Bedingungen ein Mol HCl abspaltet, das anschließend als Cl^- potentiometrisch titriert wird. Diese einfache und schnelle Methode liefert am reinen Wirkstoff gut reproduzierbare Ergebnisse.

Chemisches Verhalten beim Verseifen:

Dipterex kann einmal durch Hydrolyse seiner Chloratome zum anderen durch Verseifung seiner Estergruppen abgebaut werden. Um einen Überblick über sein Verhalten in dieser Hinsicht zu gewinnen, wurde Dipterex unter verschiedenen Reaktionsbedingungen alkalisch und sauer verseift und das dabei abgespaltene Chlor sowie die verseiften Estergruppen getrennt bestimmt. Das abgespaltene Chlor wurde nach der Verseifung in salpetersaurer Lösung potentiometrisch titriert. Die alkalisch verseiften Estergruppen wurden durch Rücktitration der überschüssigen Lauge gegen Tymolphtalein (wegen der entstehenden Phosphorsäure) bestimmt unter Berücksichtigung des Verbrauchs an Lauge für das gleichzeitig abgespaltene Chlor. Analog erfolgte die Bestimmung der sauer verseiften Estergruppen über den Säurezuwachs.

Die Ergebnisse aus zumindest Doppelbestimmungen sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt. Sie enthält neben einer kurzen Charakteristik der Verseifungsmethode

die auf Grammatome Cl bzw. Mol verseifte Estergruppen pro Mol Dipterex berechneten Werte, der Übersicht halber auf Dezimale abgerundet.

Tabelle 24

Reaktionsbedingungen	G - Atom abspaltbares Cl von Dipterex	Mole verseifte Estergruppen von Dipterex
vollständige Verseifung	3,0	3,0
theoretische Monoäthanolamin in Methanol		
1 Stunde bei 20° C	1,0	-
0,5 n Äthanol. KOH in Aceton		
15 min bei Zimmertemp.	1,2	-
0,5 n methanol.KOH		
1 Stunde kochen	1,4	1,0
0,5 n wässrige KOH		
1 Stunde kochen	2,9	2,2
2 n Äthylenglykol.KOH		
1 Stunde kochen	3,0	2,4
0,5 n H ₂ SO ₄		
5 Stunden kochen	1,0	1,4
2 n H ₂ SO ₄		
5 Stunden kochen	1,0	1,5

Dipterex spaltet das Chlor sehr leicht ab: schon beim Behandeln mit 0,5 n methanolischer Lauge in der Wärme wird das gesamte Chlor hydrolysiert. Anders jedoch ist das Verhalten bei der Verseifung der Estergruppen: selbst in 2 n glykollischer Lauge bleibt die Verseifung unvollständig.

Zur analytischen Bestimmung von Dipterex können im Prinzip alle Verseifungsmethoden verwendet werden, bei denen stöchiometrische Verhältnisse (ganze Zahlen) auftreten. Zur Bestimmung des Wirkstoffgehaltes auch in technischen Produkten sind jedoch die Methoden mit den mildesten Reaktionsbedingungen zu bevorzugen, da hierbei die Gefahr der Miterfassung von Neben- und Fremdstoffen am geringsten ist. Ferner verdient aus methodischen Gründen die Bestimmung über das alkalisch abgespaltene Chlor den Vorrang. Die saure Chlorabspaltung verläuft wesentlich langsamer. Die Bestimmung über die verseifbaren Estergruppen erfordert die zusätzliche Ermittlung des abgespaltenen Chlors und ist dadurch ebenfalls langwieriger und naturgemäß stärkeren Streuungen unterworfen.

Störung der Dipterexbestimmung durch chlorhaltige Neben- und Fremdstoffe:

Durch verschiedene Untersuchungen, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, wurde festgestellt, daß im technischen Dipterex mit der Anwesenheit geringer Mengen folgender Stoffe gerechnet werden kann: DDVP, Chloroform, Chloral, Dichloracetaldehyd, sowie der Monomethylester der Trichlorphosphorsäure, Tetrachlorkohlenstoff, DDT, HCH und Chlorknollen.

Um den Einfluß dieser Stoffe auf die Bestimmung des Wirkstoffgehaltes zu überblicken, wurden sie in möglichst reiner Form den Bedingungen der WHO-Methode für Dipterex unterworfen und das dabei abgespaltene Chlor bestimmt unter Berücksichtigung ihres zum Teil vorhandenen geringen Gehaltes an Cl^- . Die Ergebnisse dieser Versuche (Doppelbestimmungen) sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben.

Tabelle 25 Störung der Dipterexbestimmung durch chlorhaltige Stoffe

Nr.	Verbindung	% theoretisch	% abspaltbares Cl gefunden	abgespaltene g-Atome Cl	Vorkommen
1	DDVP	2 Cl = 32,09	0,09	0,006	TBP, TCP
2	Chloroform	3 Cl = 89,10	0,07	0,002	TBP, TCP
3	Chloral	3 Cl = 72,10	0,23	0,01	TBP, TCP
4	Dichloracetaldehyd	2 Cl = 62,78	0,11	0,003	TBP, TCP
5	o-Methyl(1-hydroxy-, 2, 2,2-trichloräthyl)-phosphonsäure	3 Cl = 43,70	1,51	0,16	TBP, TCP
6	P,P'-DDT	5 Cl = 50,00	0,44	0,04	Formulierungen
7	-HCH	6 Cl = 73,15	1,30	0,10	Formulierungen
8	Chlorfenson	2 Cl = 24,08	0,05	0,004	Formulierungen
9	Tetrachlorkohlenstoff	4 Cl = 92,19	0,07	0,002	Formulierungen

Nach den Versuchsergebnissen spalten eine größere Anzahl der untersuchten Stoffe (1, 2, 3, 4, 8, 9) unter den milden Reaktionsbedingungen der WHO-Methode fast kein Chlor ab. Eine weitere Anzahl (5, 6, 7) gibt nur wenig Chlor ab, sodaß ihre Anwesenheit - zumindest in geringer Menge - die Bestimmung nicht stört.

Aus den Versuchsergebnissen läßt sich leicht berechnen, um wieviel Prozent eine Dipterexbestimmung zu hoch ausfällt, wenn 3, 5, 10 usw. Prozent des betreffenden Fremdstoffes zugegen sind. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß eine echte Erhöhung der Ergebnisse nur vorliegt, wenn die Fehlergrenze der Bestimmungsmethode von etwa ± 1 % (siehe nächster Abschnitt) überschritten wird. Aus solchen Betrachtungen ergibt sich zusammenfassend:

Bei der Wirkstoffbestimmung in technischem Dipterex nach der WHO-Methode erhöhen DDVP, Chloroform, Chloral oder Dichloracetaldehyd bis zu 10 %, sowie der Monoester bis zu etwa 5 % die Ergebnisse nicht merklich. In Formulierungen von Dipterex stören ebenfalls Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, DDVP und Chlorknorpel nicht. DDT verursacht erst ab 30 % HCH über 10 % zu hohe Ergebnisse.

Reproduzierbarkeit der Dipterexbestimmung:

Die Reproduzierbarkeit wurde aus den Spannweiten von rund 50 Doppelbestimmungen an verschiedenen Dipterexmustern ermittelt. Der Wirkstoffgehalt lag zwischen 75 und 100 %, im Mittel 95 %. Seine Streuungen werden ausschließlich durch die unvermeidbaren Streuungen bei der Bestimmung des abgespaltenen Chlors verursacht. Der Gehalt an Chlorid betrug nur in Einzelfällen bis zu 0,05 %.

Nach den Regeln der statistischen Fehlerrechnung ergaben sich mit 95 % statistischer Sicherheit für die Standardabweichungen (S) und die Vertrauensbereiche der Mittelwerte von Doppelbestimmungen (VB) folgende Werte:

$$\begin{aligned} S &= \pm 0,083 \% \text{ Cl}^- = \pm 0,60 \% \text{ Dipterex} \\ \text{VB} &= \pm 0,12 \% \text{ Cl}^- = \pm 0,90 \% \text{ Dipterex} \end{aligned}$$

Um diese Genauigkeit einzuhalten, dürfen die Einzelwerte bei der Bestimmung des abspaltbaren Chlors um nicht mehr als 0,23 % Cl^- = 1,7 % Dipterex abweichen (sog. erlaubte Differenz). Andernfalls muß die Bestimmung wiederholt werden.

Arbeitsvorschrift zur Bestimmung des Wirkstoffgehaltes von Dipterex:

Versuchsanordnung:

Reagenzien: Methanol p.a.

Monoäthanolamin (2-Aminoäthanol)

reinst oder rein

Salpetersäure, 20 %ig, p.a.

0,1 n AgNO_3 -Lösung

Versuchsdurchführung:

Bestimmung des abspaltbaren und nichtionogenen Chlors:

Etwa 1 g Probe werden in einen 250 ml-Weithalskolben genau eingewogen (E_1 g) und in 90 ml Methanol gelöst. Die Lösung wird im Thermostaten auf $20,0 \pm 0,5^\circ \text{C}$ temperiert und dann mit 10 ml ebenso temperierten Mono-

Äthanolamin versetzt. Das Gemisch wird genau 1 Stunde lang im Thermostaten gehalten und dann 5 min lang in Eiswasser gestellt. Nach Zugabe von 50 ml Salpetersäure wird das Cl^- bei Zimmertemperatur potentiometrisch mit 0,1 n AgNO_3 -Lösung titriert (a ml).

Bestimmung des ionogenen Chlors:

Etwa 1 g Probe werden in ein 250 ml Becherglas genau eingewogen (E_2 g), mit 100 ml Wasser versetzt, gut umgeschüttelt und 5 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach Zugabe von 5 ml Salpetersäure wird das Cl^- potentiometrisch mit 0,1 n AgNO_3 -Lösung titriert (b ml).

Berechnung:

$$\% \text{ Dipterex} = \left(\frac{a}{E_1} - \frac{b}{E_2} \right) \cdot 2,574$$

4. Reduktion von Kaliumpermanganat nach YAMASHITA (1961)

KMnO_4 wird im allgemeinen von organischen Verbindungen mit ungesättigter Kette reduziert. Diese Reaktion bietet daher eine Möglichkeit DDVP von Dipterex und anderen phosphororganischen Verbindungen zu unterscheiden.

Man stellt dazu von den phosphororganischen Verbindungen technischer Qualität Standardlösungen in Alkohol her, die 25, 50, 100, 500 und 1000 $\mu\text{g/ml}$ von jeder Probe enthalten. Ein Milliliter der Lösung wird in das Testreagenzglas abpipettiert und 1 Tropfen 0,1 %ige KMnO_4 -Lösung wird hinzugegeben. Nachdem die Mischung 1 min lang geschüttelt worden ist, kann die Entfärbung

der Lösung geprüft und bestimmt werden. DDVP und Phosdrin bei 100 $\mu\text{g/ml}$. Alle anderen phosphororganischen Verbindungen (Äthylparathion, Methylparathion, Paraoxon, EPN, Diazinon, Dipterex, TEPP, Malathion, Gusathion, Systox, Metasystox) sprechen auf diesen Test nicht an.

5. Chromotropsäuremethode nach YAMASHITA (1961)

Aufgrund der Methoxygruppe können Dipterex und DDVP qualitativ und quantitativ dadurch bestimmt werden, daß man sie zu Methanol hydrolysiert und dieses mit der Chromotropsäuremethode bestimmt.

Versuchsanordnung:

Reagenzien:	5 %ige	Phosphorsäurelösung
	5 %ige	KMnO_4 -Lösung
	20 %ige	Chromotropsäurelösung
	1 %ige	Chromotropsäurelösung
		konz. H_2SO_4

Versuchsdurchführung:

Die Standardkurven erhielt man wie folgt:

Die Probe wird mit einer 30 % NaOH-Lösung 1 Stunde lang hydrolysiert und anschließend destilliert. Zu 1 ml des Destillats gibt man 0,1 ml einer 5 %igen Phosphorsäurelösung hinzu und 0,2 ml einer 5 %igen KMnO_4 -Lösung. Die Mischung läßt man 10 min stehen und gibt daraufhin 0,3 ml einer 20 %igen Na-sulfitlösung hinzu, sowie 1 Tropfen der Chromotropsäurelösung und 3 ml konz. H_2SO_4 .

Daraufhin zeigt sich eine purpurrote Farbe. Die Absorption der Farblösung wird gegen eine Blindprobe bei $570\text{ m}\mu$ unter Verwendung des elektrischen Spektrophotometers gemessen. Als Standardkurve ergibt sich für die Probe im Bereich von $10 - 50\text{ }\mu\text{g}$ eine Gerade:

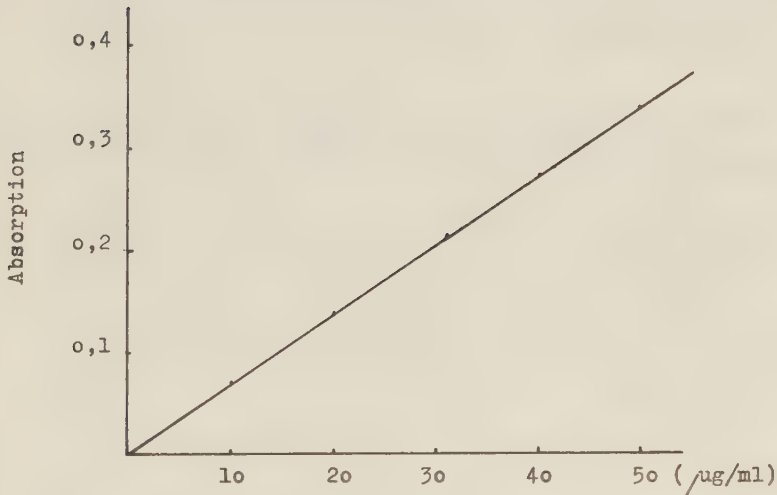


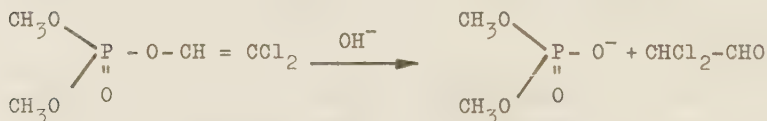
Fig. 4: Standardkurve von Methanol für die Chromotropsäuremethode nach YAMASHITA (1961)

6. Jodometrische Methode nach GEIGER und FÜRER (1960)

Bekanntlich zerfällt das Molekül DDVP hydrolytisch in Dimethylphosphorsäure und Dichloracetaldehyd, in saurer Lösung langsam, in alkoholischer Lösung dagegen sehr rasch. Die Dimethylphosphorsäure kann dabei als einbasische Säure titrimetrisch erfaßt werden. Der gebildete Dichloracetaldehyd ist in alkalischem Medium instabil und wird unter Bildung von Ameisensäure und ionogenem Chlor weiter abgebaut.

Es gelingt nun aber den bei der alkalischen Spaltung gebildeten Dichloracetaldehyd zu bestimmen, bevor er durch Nebenreaktionen verändert wird:

wenn die Hydrolyse in Gegenwart eines Überschusses an Jod durchgeführt wird, oxydiert sich der Aldehyd quantitativ zur Dichloressigsäure unter Verbrauch von 2 Äquivalenten Jod. In saurer oder neutraler Lösung wirkt Jod weder auf DDVP noch auf Dichloracetaldehyd mit nennenswerter Geschwindigkeit ein:



Bei der Durchführung der Bestimmung ist zu beachten, daß die Lauge erst nach dem Jod zugefügt wird, obwohl die hydrolytische Spaltung die erste Stufe des Reaktionsablaufes darstellt. Wird umgekehrt verfahren, so wird zu wenig Jod verbraucht, was dem Umstand zuzuschreiben ist, daß sich dann bereits ein Teil des Dichloracetaldehyds durch Nebenreaktionen der Oxydation durch das Jod entzogen hat. Mit dieser Methode ist es nun allerdings nicht möglich zwischen DDVP und freiem Dichloracetaldehyd zu unterscheiden. Dies wäre vor allem beim Arbeiten mit DDVP im sauren Bereich zu wünschen.

Eine Bestimmung von DDVP neben Dichloracetaldehyd läßt sich indessen durch die alkalische Spaltung ohne Jod-oxydation durchführen, indem man die wässrige DDVP-Lösung zuerst genau neutralisiert und anschließend das DDVP mit überschüssiger Lauge spaltet. Durch Rücktitration der überschüssigen Lauge läßt sich die gebildete Menge Dimethylphosphorsäure und damit im Prinzip die äquivalente ursprüngliche Menge DDVP ermitteln. Der tatsächliche Reaktionsverlauf ist jedoch deshalb nicht so einfach, weil die im Überschuß vorhandene Lauge auch auf den intermediär gebildeten Dichloracetaldehyd einwirkt und teilweise zur Neutralisation von sauren Spaltprodukten verbraucht wird. Dadurch, daß die Geschwindigkeiten der Haupt- und Nebenreaktionen abhängig von Temperatur und Laugenkonzentrationen sind, erhält die Bestimmungsmethode einen empirischen Charakter. Es ist möglich, die Reaktionsbedingungen so zu wählen, daß je Mol DDVP genau 1 Äquivalent Lauge verbraucht wird. DDVP-Proben, die frei von Dichloracetaldehyd sind, ergeben somit die gleichen Werte wie mit der jodometrischen Bestimmungsmethode. Enthält eine DDVP-Probe vor

der Spaltung schon Dichloracetaldehyd, so kann dieser durch eine Kombination dieser beiden Analysenmethoden bestimmt werden.

Jodometrische Methode:

Für die Ausarbeitung dieser Methode wurde eine 0,05 m wässrige Lösung (1,105 g/100 ml) von reinem DDVP (hergestellt aus Trimethylphosphit und Chloral) verwendet. Analyse des verwendeten DDVP:

$C_4H_7O_4PCl_2$	Ber.:	C 21,74	H 3,19	Cl 32,09	P 14,02
	gef.:	C 21,83	H 3,21	Cl 32,32	P 14,07

Freie Säure: 0,488 mg NaOH/g entsprechend 0,27 Mol %.

20 ml dieser Lösung, entsprechend 1 m Mol DDVP werden nacheinander mit 25 ml 0,1 n Jodlösung und 10 ml 2 m NaOH-Lösung versetzt. Die schwach gelbe Lösung wird 5 - 10 min bei Raumtemperatur verschlossen stehen gelassen und nach dieser Zeit mit 10 ml 4 n Salzsäure versetzt. Das freigewordene Jod wird anschließend mit 0,1 n Thiosulfatlösung zurücktitriert unter Verwendung von Stärkelösung zur Endpunktbestimmung.

Der Jodverbrauch betrug in diesem Beispiel $19,9 \pm 0,05$ ml. Da 1 Äquivalent Jod 0,5 Mol DDVP entspricht, berechnet sich für das analysierte Muster ein Gehalt von $99,5 \pm 0,25$ %.

Fehlerquellen: Es soll nochmals betont werden, daß zu niedrige Werte erhalten werden, wenn die Lauge vor dem Jod zugefügt wird. Die Verwendung eines großen Jodüber-

schusses ergibt dagegen etwas zu hohe Werte, weshalb bei Proben unbekannten DDVP-Gehaltes nach Möglichkeit eine orientierende Vorbestimmung durchgeführt werden soll.

Die Methode ist empfindlich auf oxydierbare Substanzen insbesondere Methyylketone, die mit alkalischer Jodlösung sofort Jodoform bilden.

Die Bestimmung kann auch in methanolischer Lösung durchgeführt werden, in diesem Fall ist es aber notwendig bei 0° C zu arbeiten.

Bei der Verwendung von höheren Alkoholen ist der Jodverbrauch einer Blindprobe in Rechnung zu setzen. Als Beispiel sei die Bestimmung einer Lösung von 20 % DDVP in Butylcarbitol erwähnt: 10 g dieser Lösung werden mit Wasser auf 500 ml verdünnt und von dieser Lösung ein aliquoter Teil zur Bestimmung verwendet. Die Bestimmung bei 20° C und 0° C ergibt praktisch die gleichen Werte, ein Blindwert von etwa 2 % muß vom Resultat abgezogen werden. Kohlenwasserstoffe stören die Bestimmung im Prinzip nicht, dagegen ist bei ihrer Gegenwart notwendig, die Probe intensiv zu rühren oder zu schütteln, um den Transport des in der organischen Phase gelösten DDVP in die wässrige Phase zu beschleunigen und eine einwandfreie Titration des überschüssigen Jodes zu ermöglichen. In dieser Weise gelingt es auch, den DDVP-Gehalt von Aerosol-Formulierungen zu bestimmen. Die Anwesenheit von Freon 11/12 stört die Bestimmung nicht.

Alkalische Spaltung:

Für die Ausarbeitung dieser Bestimmungsmethode wurde wiederum eine 0,05 m Lösung von reinem DDVP verwendet.

50 ml dieser Lösung werden auf 0° - 1° C abgekühlt und mit Lauge oder Säure auf Methylrot neutral gestellt. Dann werden 10 ml 1 n NaOH-Lösung zugesetzt, die Mischung wird 20 min im Eisbad stehen gelassen und darauf mit 0,2 n Salzsäure zurücktitriert. Verbrauch: 7,5 ml 1 n Säure entsprechend 2,5 ml 1 n Natronlauge, also 2,5 m Mol, entsprechend 100 % des eingesetzten DDVP. Bei sorgfältigem Arbeiten kann mit einer Genauigkeit von ± 1 % gerechnet werden.

Der Einfluß der Reaktionszeit, der Konzentration von DDVP und Lauge, sowie der Reaktionstemperatur auf den Laugenverbrauch bzw. auf die Erfassung des eingesetzten DDVP geht aus der folgenden Zusammenstellung hervor:

Tabelle 26

Zeit Minuten	Konz. DDVP mMole/60 ml	Konz. Lauge Normalität	Temp. $^{\circ}$ C	DDVP gef. %
20	2,5	1/6 n	0-1	100
20	1,25	1/6 n	0-1	100
20	0,5	1/6 n	0-1	etwa 100*
20	0,25	1/6 n	0-1	etwa 100*
20	1,88	1/4 n	0-1	104
20	0,94	1/8 n	0-1	96
20	0,47	1/16 n	0-1	87
20	0,23	1/32 n	0-1	54
5	2,5	1/6 n	0-1	76
10	2,5	1/6 n	0-1	88
15	2,5	1/6 n	0-1	99
20	2,5	1/6 n	0-1	100

25	2,5	1/6 n	0-1	103
30	2,5	1/6 n	0-1	106
20	2,5	1/6 n	0	100
20	2,5	1/6 n	5	106
20	2,5	1/6 n	10	116

*) Wegen des zu geringen Laugenverbrauches läßt sich dieser Wert nur auf etwa $\pm 10\%$ genau bestimmen.

Liegt zur Bestimmung ein DDVP ohne freien Dichloracetaldehyd vor, so decken sich die Resultate der jodometrischen und der Spaltungsmethode. Bei Gegenwart von freiem Dichloracetaldehyd dagegen fällt die jodometrische Analyse höher aus. Dies kommt daher, daß Dichloracetaldehyd unter den Bedingungen der jodometrischen Analyse 2 Äquivalente Jod verbraucht, während bei der alkalischen Spaltung unter den definierten Bedingungen nach empirischer Feststellung nur 0,17 Mol Lauge neutralisiert werden.

Durch eine einfache Rechnung kann aus den Werten der beiden Bestimmungen der Gehalt des untersuchten Präparates an beiden Komponenten ermittelt werden:

Bezeichnen wir die gesuchte Anzahl Millimole DDVP der Probe mit "x", die Anzahl Millimole Dichloracetaldehyd mit "a" und die bei der Spaltung gebrauchte Anzahl Milliliter mit "b", so ist

$$y = (a - b) \cdot 1,2 \quad \text{und}$$

$$x = a - y = 1,2b - 0,2a.$$

Am besten läßt sich dies an einem praktischen Beispiel demonstrieren:

2,5 m Mol DDVP + 0,5 m Mol Dichloracetaldehyd in 50 ml wässriger Lösung werden einerseits nach der jodometrischen und andererseits nach der alkalischen Spaltungsmethode titriert. Es werden $60 \pm 0,2$ ml 0,1 n Jodlösung verbraucht, entsprechend $a = 3,00 \pm 0,01$ m Mol DDVP + Dichloracetaldehyd. Die Spaltung ergibt einen Laugeverbrauch $b = 2,58 \pm 0,01$ ml 1 n NaOH-Lösung. Nach den beiden Gleichungen ergibt sich für $x = 1,2 \cdot 2,58 - 0,2 \cdot 3,00 = 2,50$ m Mol DDVP und für $y = (3,00 - 2,58) \cdot 1,2 = 0,50$ m Mol Dichloracetaldehyd. Die Titrationsfehler von $\pm 0,01$ ml 1 n ergeben in diesem Fall für x eine Fehlerbreite von etwa $\pm 0,5$ %, für y aber von etwa ± 5 %. Wenn y in einer Mischung gegenüber x weiter zurücktritt, wird natürlich der Fehler für y entsprechend noch größer.

Daraus geht hervor, daß die alkalische Spaltung nicht eine Bestimmungsmethode für Dichloracetaldehyd neben DDVP, sondern umgekehrt eine solche für DDVP in Gegenwart von Dichloracetaldehyd darstellt.

Bei Gegenwart von organischen Lösungsmitteln muß von Fall zu Fall geprüft werden, ob sich diese auf die Bestimmung störend auswirken können.

7. Die Dichromatoxydation von Dipterex und der Pyridin-
alkali - FUJIWARA-Test nach GIANG, BARTHEL und HALL
(1954)

Bei dieser Methode wird das o,o-dimethyl-2,2,2-trichloro-
-hydroxyphosphonat durch Dichromatoxydation zu Chloral
und Dimethylhydrogenphosphit gespalten:



Das Chloral wird von Alkali in Chloroform übergeführt, so-
dann von einer wässrigen Pyridinlösung absorbiert und ent-
wickelt, wie von FUJIWARA in nachfolgender Gleichung be-
schrieben wird, nach Erhitzen eine rote Farbe.



Versuchsanordnung:

Reagenzien: Kaliumdichromat-Schwefelsäurelösung:
60 ml konzentrierte Schwefelsäure wird lang-
sam zu 100 ml einer 15 % Kaliumdichromat-
lösung zugegeben.

Pyridin: redestilliert

2,5 - N NaOH-Lösung

Versuchsdurchführung:

Die Standardkurve erhielt man wie folgt:

Die Standardätherischen Lösungen von Dipterex wurden vorbereitet, die 20 - 200 μ g der Probe enthielten. Etwas von der Probelösung in einem Reagenzglaschen wurde in einem Wasserbad vollkommen vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde mit 0,5 ml Kalium-dichromat-Schwefelsäurelösung in einem siedenden Wasserbad 10 min lang erhitzt, in einem Eisbad genügend abgekühlt und anschließend zu 5 ml Pyridin, 8 ml einer 2,5 N NaOH-Lösung hinzugegeben. Nachdem man dies gut durchgemischt hatte, erhitzte man es 3 min lang in einem Wasserbad von 90⁰ C und kühlte es anschließend mit Leitungswasser. Die gefärbte trübe Pyridinschicht wurde durch ein "Toyo-Filterpapier" abgefiltriert. Die klare karminrote Farbe des Filtrats war 30 min lang stabil. Die Absorption der karminrot gefärbten Lösung wurde gegen eine Blindprobe unter Verwendung eines "SHIMAZU GB 50-electric spectrophotometer" gemessen.

Ergebnisse und Diskussion:

Die Absorptionskurven sind nachfolgend angegeben:

Sie besitzen 2 Peaks bei 360 m μ und 530 m μ . Wenn man diese Messung mit letztgenannter Wellenlänge durchführte, ergab sich für die Probe von 20 - 200 μ g als Standardkurve eine Gerade.

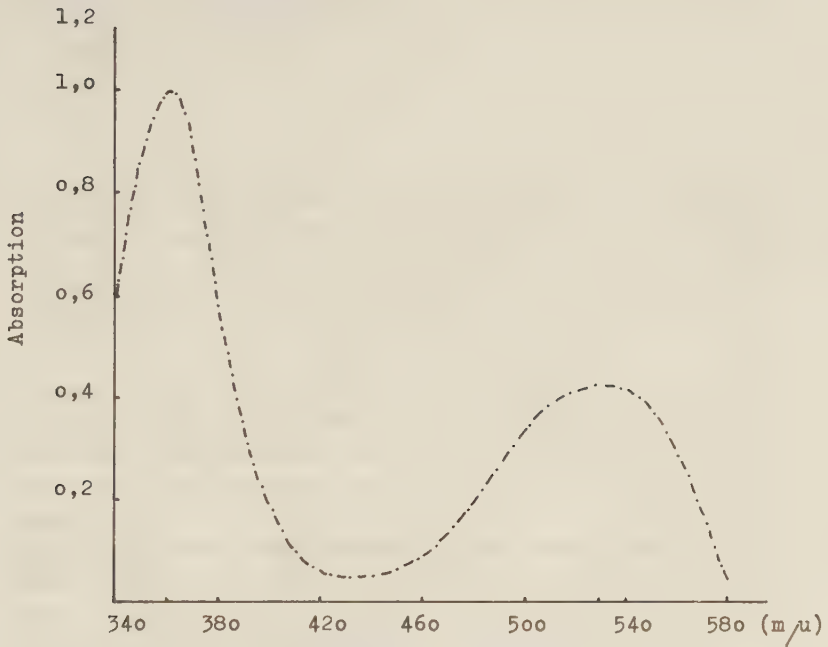


Fig. 5: Absorptionswellenlängenkurve von Dipterex für die Dichromatoxydationsmethode angewendet auf den Pyridinalkali-FUJIWARA-Test nach YAMASHITA (1961)

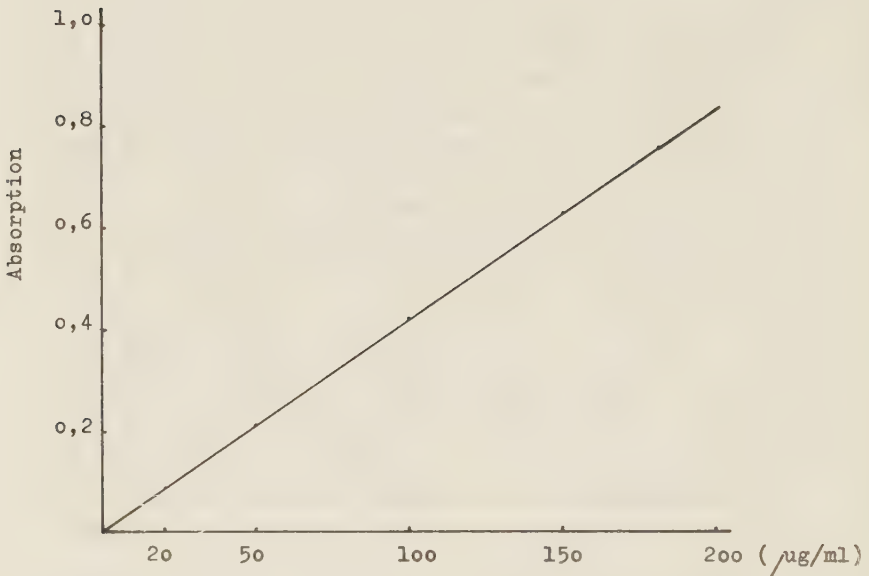


Fig. 6: Standardkurve von Dipterex für die Dichromatoxydationsmethode angewendet auf den Pyridinkali-FUJIWARA-Test nach YAMASHITA (1961)

Die Dichromatoxydationsmethode wurde auch auf andere phosphororganische Verbindungen, auf gewisse Gifte und Arzneimittel angewendet. Von allen phosphororganischen Verbindungen zeigte nur Dipterex eine positive Reaktion auf diesen Test und entwickelte eine helle, rote Farbe. Alle anderen phosphororganischen Verbindungen reagierten negativ. Jedoch zeigten Pestox-3, Gusathion und DDVP, die entweder

Chloroform oder Chloral enthielten auch eine schwache Rotfärbung. Von den anderen getesteten Giften und Arzneimitteln zeigte nur Chloralhydrat eine positive Reaktion.

8. Der Nachweis von Dipterex durch Spaltung der Phosphorcarbonbindung bei 70° C zum Phosphitester und dessen Reaktion mit 3,5-Dinitrobenzoesäure in wässrigem Na-bicarbonat nach MUSTAFA und Mitarb. (1966)

MUSTAFA, SIDKY, EL DARAWY und KAMEL haben ein Verfahren entwickelt, das den Nachweis und die mengenmäßige Bestimmung von Dialkylphosphit umfaßt, das bei der Trennung der Phosphorcarbonbindung in Dipterex bei 70° C entsteht. Diese Phosphitester entwickeln eine stabile blauviolette Farbe, wenn man sie mit einer 3,5-Dinitrobenzoesäure in wässrigem Na-bicarbonat reagieren läßt. Diese Methode ist einfach und kann auf einem Filterpapierstreifen (Flecken-colorimetrie) in routinemäßiger toxikologischer Analyse ausgeführt werden. Dehydrochlorierte Verbindungen, z.B. DDVP anstelle von Dipterex, mengen sich bei der Bildung von Dimethylphosphorsäure über die Hydrolyse nicht ein und die blaue Farbe entwickelt sich nicht. Auf der Basis der vorgeschlagenen Farbreaktion kann eine Differenzierung zwischen Dipterex und den entsprechenden dehydrochlorierten Verbindungen getroffen werden. Eine frisch bereitete Na-bicarbonat-Reagenslösung wurde dabei als wesentlich für die Farbentwicklung erachtet. Wenn man den Test auf trockenem Filterpapier, das mit dem Reagens

imprägniert war ausführt, stieg die Empfindlichkeit merkbar an. Man kann diesen Test auch zum Nachweis von *Dipterex* auf Papierchromatogrammen anwenden.

Versuchsaufbau:

Die Farbflecken wurden mit Hilfe der Reflektionsdensitometriechnik geprüft. Ein Extinktionsdensitometer ausgestattet mit einem Registrierzähler (Type ER I 10, Carl ZEISS, JENA) und mit Filter Nr. 2 (550 m μ) wurde zur Messung der Reflektion der Flecken verwendet. Das Gerät arbeitete mit dem Schlitz auf Marke 5.

Versuchsdurchführung:

Streifen von WHATMAN Nr. 54 Filterpapier wurden homogen mit einer frisch bereiteten Lösung von 3,5-Dinitrobenzoesäure (1 Gramm), gelöst in 40 ml 5 % wässrigem Na-bicarbonat, imprägniert und danach getrocknet. Das Reagenspapier wurde darauf mit einer Lösung der Testsubstanz von (0,05 ml) bekannter Konzentration in Chloroform behandelt. Es wurde mit Sorgfalt darauf geachtet, daß runde Flecken von ungefähr 5 mm Durchmesser sicherzustellen. Nachdem der Papierstreifen trocken war, wurde er in einem Luftofen auf 70° C genau 2 min lang erhitzt und die blauviolette Farbe entwickelte sich. Das Gebiet der Reflektionswellenlängenkurve wurde entweder mit einem Planimetriergerät oder mit der Quadratzahlmethode ausgemessen. Man kann es ruhig zulassen, daß die Streifen transparent werden, indem man Methylphenyläther, Benzylalkohol oder eine Mischung von α -Bromonaphthalin und flüssigem Paraffin verwendet, so führt dies zu keiner

Verbesserung der Ergebnisse, anscheinend deshalb, weil die Farbe in diesen organischen Lösungsmitteln unstabil ist. Zur Konstruktion der Kalibrierungskurven trug man die Durchschnittswerte, ermittelt aus 10 Feldern von Flecken derselben Konzentration, als Funktion der Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) auf. Es ergaben sich Geraden.

Ergebnisse und Diskussion:

Die Kurven A stellen die Abweichung des Gebiets unter den verschiedenen Reflektionswellenlängenkurven und die Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) von Dimethyl-, Diäthyl- und Diisopropylphosphiten dar. In allen Fällen ist das Relationsverhältnis linear.

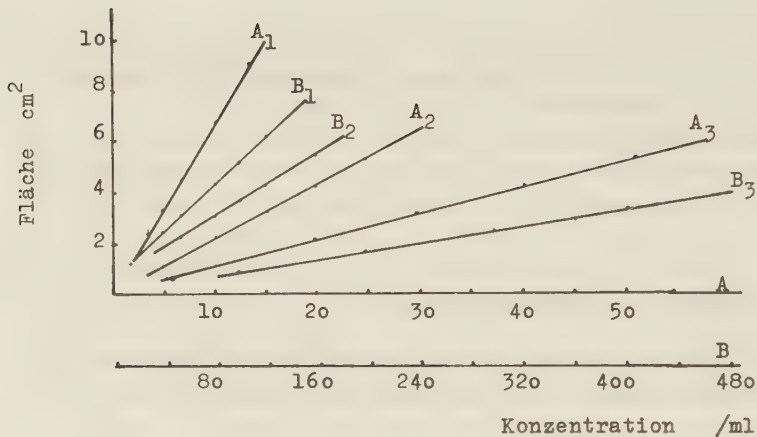


Fig. 7: Beziehung zwischen der Fläche unter den Reflektionswellenlängenkurven und der Konzentration nach MUSTAFA (1966)

- A₁ Dimethylphosphit
- A₂ Diäthylphosphit
- A₃ Diisopropylphosphit
- B₁ 0,0-Dimethyl(1-hydroxy-2,2,2-trichloroäthyl)phosphat, Dipterex (Ia)
- B₂ 0,0-Diäthyl(1-hydroxy-2,2,2-trichloroäthyl)-phosphat (Ib)
- B₃ 0,0-Diisopropyl(1-hydroxy-2,2,2-trichloroäthyl)-phosphat (Ic)

Für die gleiche Konzentration nimmt die Fläche in folgender Reihenfolge zu:

Dimethyl- > Diäthyl- > Diisopropylphosphit

So kleine Konzentrationen wie 2,5 und 10 μ /ml können ohne jede Schwierigkeit für die obigen 3 Ester aus diesen Kalibrierungskurven entnommen werden.

Die Kalibrationskurven B sind für Dipterex und seine entsprechenden Äthyl- und Isopropylanaloga angegeben. Innerhalb der experimentellen Konzentrationsreihe, die untersucht wurde, befolgte man das Lambert-Beer'sche Gesetz. Der Test ist für Dipterex (I a) empfindlicher als für seine Äthyl- (I b) oder Isopropyl- (I c)analoga, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der entsprechenden Dialkylphosphitester (siehe Figur). Daß der Test für Dipterex und seine Homologe weniger empfindlich ist als für die entsprechenden Dialkylphosphite kann man plausiblerweise auf die unvollständige Spaltung der Phosphorcarbonbindung zurückführen, um unter den vorherrschenden experimentellen Bedingungen das entsprechende Dialkylphosphit zu liefern oder die positive Umwandlung einiger Dipterexverbindungen in DDVP während der Dauer der Analyse. Dies ist jedoch zu erwarten, da es bekannt ist, daß die totale Spaltung der α -Hydroxyphosphonate bei Temperaturen stattfindet, die höher sind als die, die bei den hier angegebenen Untersuchungen angewendet wurden. Versuche, die Temperatur über 70° C zu steigern, lieferten Formationen von braunschwarzen Flecken als Ergebnis.

III. Der Nachweis von Dipterex und DDVP in Rückständen
nach der Agar-Diffusionsmethode nach ACKERMANN,
ENGST und FECHNER (1968)

Wegen der einfachen Handhabung und der Möglichkeit eine große Anzahl von Proben innerhalb relativ kurzer Zeit gleichzeitig zu untersuchen, eignet sich die von SANDI (1962) entwickelte und von ACKERMANN, ENGST und FECHNER modifizierte Agar-Diffusionsmethode besonders für Routinebestimmungen. Bei Vorliegen von Rückständen können diese anhand der Hemmringdurchmesser hinreichend genau quantitativ ermittelt werden. Bei diesem enzymatischen Nachweis insektizider Phosphorsäureester ist allerdings eine Differenzierung zwischen Dipterex und DDVP nicht zu erzielen.

Versuchsanordnung:

Geräte: Zentrifuge mit 50 ml Zentrifugengläsern, 5000 U/min, Glasplatten 9 x 12 cm, 1 ml Pipetten, Mikropipetten, Teilung 1/ul.

Reagenzien: Äthanol; Chloroform, dest.; Benzol, reinst, dest.; Aceton, reinst, dest.; NaCl zur Anal.; Na₂SO₄, wasserfrei; Kieselgel G "MERCK"; Agar-Agar; Bromthymolblau, 0,1 %ig in 20 %igem Alkohol; 0,05 n-Natronlauge, Acetylcholinchlorid.

Enzymlösungen: Pferdeserum, flüssig.

Substratlösungen: 0,4 %ige wässrige Acetylcholinchloridlösung; haltbar im Kühlschrank 1 Tag.

Pestizidlösungen: 1 μ g Dipterex/ml abs. Äthanol; Haltbarkeit 1 Woche im Kühlschrank. Aus dieser Stammlösung werden vor jeder Bestimmung durch Verdünnen mit Wasser die Meßlösungen hergestellt. (Konzentration: 0,1 - 1 μ g/ml).

DDVP-Stammlösung: 1 mg Wirkstoff/ml Chloroform.

Extraktion:

40 - 50 ml Milch werden zur Abtrennung des Fettanteils 10 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Von der fettfreien Milch werden 25 ml abgenommen und mit 100 ml Äthanol versetzt. Zur weitgehenden Fällung des Eiweißes wird ca. 30 min schwach gerührt und anschließend durch ein hartes Filter filtriert. 25 ml des Filtrats engt man im Vakuum bei einer Badtemperatur von 40° C auf ca. 4 ml ein. Dieser wässrige Extrakt wird mit 0,05 n-Natronlauge auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt (Indikationspapier), mit Wasser auf 5 ml ergänzt und ohne weitere Reinigung für die Analyse benutzt.

Agar-Diffusionsmethode:

Für die Herstellung von 1 l Agar werden 20 ml Serum benötigt. Der Durchmesser der in das Agargel eingestanzten Löcher wird auf 18 mm erweitert, sodaß 1 ml der Probelösung (Extrakt von 1 ml Milch) einpipettiert werden kann. Weiterhin werden zur Verkürzung der Diffusionszeit die Platten bei 38° C in einem Brutschrank aufgestellt. Dadurch kann die Auswertung der Hemmringdurchmesser bereits nach 4 - 6 Stunden anstelle von 18 Stunden ohne Verringerung der Nachweisempfindlichkeit vorgenommen werden.

Die quantitative Auswertung wird anhand einer Eichkurve mit Standardkonzentrationen zwischen 0,1 und 1 μg durchgeführt, wodurch der quantitative Nachweis von 0,1 mg/kg ermöglicht wird. Es können jedoch noch kleinere Mengen (etwa 0,05 mg/kg) nachgewiesen werden.

D) METABOLISMUS

I. Toleranzentwicklung bei kontinuierlicher Verabreichung von Dipterex nach SHIMAMOTO und HATTORI (1966)

Die Vergiftung von Mammaliern durch phosphororganische Verbindungen wird im allgemeinen auf die Hemmwirkung der Acetylcholinesterase zurückgeführt. Es wurde jedoch darüber berichtet, daß die Hemmung der Pseudocholinesterase (PChE) durch phosphororganische Verbindungen in keinem Zusammenhang mit den Vergiftungserscheinungen stand. Je kürzer die Dauer der toxischen Symptome ist, umso schneller läuft die Reaktionsgeschwindigkeit des gehemmten Enzyms ab. McNAMARA und Mitarb. (1954) haben gezeigt, daß der Skelettmuskel der mit phosphororganischen Verbindungen vergifteten Tiere seine Funktion merkbar von der Reaktivierung der AChE wiedererhielt. Sie haben daher postuliert, daß die Wiedergewinnung der Funktion

1. von der Abnahme des Blutcholinesterasebetrages,
2. von der Freisetzung eines kleinen Betrages Acetylcholin durch die Nervenendigungen oder/und
3. von der abgenommenen Empfindlichkeit des Muskels gegenüber Acetylcholin abhängt.

SHIMAMOTO und HATTORI konnten zeigen (Wistar-Ratten), daß eine stetige Aufnahme von Dipterex, das in einzelnen Probedosen kontinuierlich verabreicht wurde, einen Abfall der Cholinesterase (ChE) bis zu einem Betrag verursachte, der oftmals über mehrere Wochen gleich-

blieb. (Toleranzentwicklung). Dieser "steady-state-Wert" mag gewissermaßen das Gleichgewicht zwischen Hemmung und Synthese der frischen Enzyme ausdrücken. Die Hemmwirkung von Dipterex trat vor allem in der Erythrozyten- und der Leber-ChE zutage, am wenigsten in der Herz-ChE. Die Spitzenhemmung der Gewebs-ChE, die durch Dipterex verursacht wurde, stellte sich gemäß ihren Angaben nach der 6. und 9. Woche der Verabreichung ein und zeigte dann Erholungszeichen. Daraufhin schien sich die Toleranzentwicklung oder eine gesteigerte Synthese der frischen ChE, die über den Betrag der irreversiblen Hemmung des Enzyms hinausreichte, infolge der weitverbreiteten Verabreichung einzustellen. Obgleich jedoch die Gewebs-ChE-Aktivität bei den Ratten, die die täglichen Dosen erhielten merklich unterdrückt wurde, so konnte doch keine Änderung des Verhaltens der Tiere oder irgendwelche pathologischen Befunde in den Geweben beobachtet werden (Adaptionsprozeß).

1. Abbaugeschwindigkeit von Dipterex nach SCHWARZ und
DEDEK (1965)

H. SCHWARZ und W. DEDEK haben die Abbaugeschwindigkeit von Dipterex im Serum (Schwein) bei 38° C in vitro untersucht. Die Halbwertszeit der Spaltung beträgt bei einer Dosis von 10 µg Dipterex/ml Serum 23 min, wie aus der Figur 8 ersichtlich ist. Im Bereich der toxischen Konzentrationen des Dipterex (>500 µg/ml Serum) wird der Abbau in vitro mit steigender Konzentration immer mehr gebremst, da vermutlich die wirksamen Fermente

in zunehmendem Maße blockiert werden.

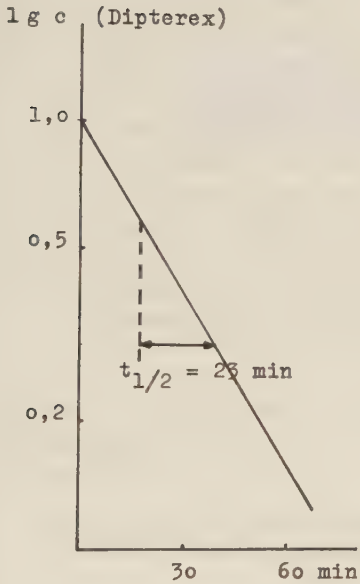


Fig. 8: Abbau von Dipterex im Schweineserum in vitro bei 38°C, Dosis 10 μg Dipterex/ml Serum nach SCHWARZ und DEDEK (1965)

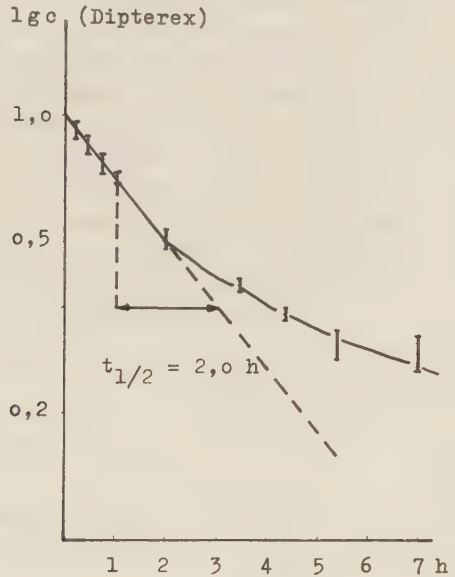


Fig. 9: Abbau von Dipterex im Darminhalt des Schweines in vitro bei 38,5°C pH 7, Dosis 20 μg /g Darminhalt nach SCHWARZ und DEDEK (1965)

Im Rinderserum beträgt die Halbwertszeit der Spaltung von Dipterex unter gleichen Bedingungen 32 min. Der Abbau erfolgt also im Schweineserum mit deutlich größerer Geschwindigkeit als im Rinderserum.

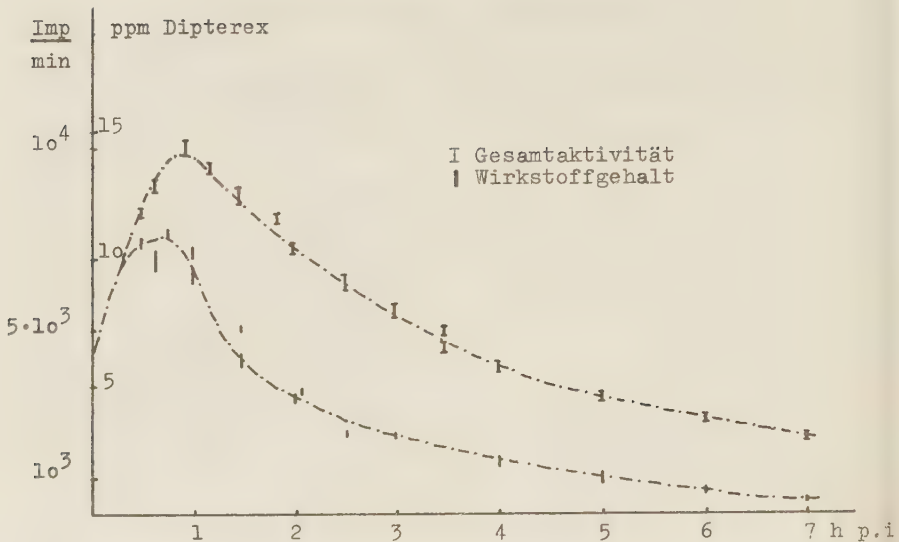


Fig. 10: Dipterex im Schweineblut nach sbc.-Injektion von 25 mg/kg nach SCHWARZ und DEDEK (1965)

In Figur 10 werden die Ergebnisse von insgesamt 5 in vivo Versuchen zusammengefaßt. Der Wirkstoffanteil der Gesamtaktivität nimmt laufend ab. Während zu Beginn etwa 90 % der Gesamtaktivität aus Dipterex bestehen, sind es 6 Stunden p.i. nur noch etwa 25 %. Das Maximum der Wirkstoffkonzentration im Blut wird bereits nach 15 - 60 min mit 10-11 ppm erreicht. 6 Stunden p.i. konnten noch 1 ppm Dipterex nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung der Abbaugeschwindigkeit des Dipterex im Darminhalt *in vitro* bei $38,5^{\circ}\text{C}$ (pH 7) wurde festgestellt, daß bei einer Dosis von $20\text{ }\mu\text{g/g}$ Darminhalt = 20 ppm das Dipterex anfangs mit konstanter Halbwertszeit von 2 Stunden abgebaut wird. Später wird der Abbau immer mehr gebremst (Figur 9). Vermutlich werden die im Darminhalt anwesenden das Dipterex abbauenden Fermente unter diesen Bedingungen bereits partiell blockiert, sodaß die Entgiftung immer langsamer verläuft. Bei der *in vivo* im Darminhalt gefundenen maximalen Konzentration von 4 - 5 ppm (Figur 11) sollte dieser Effekt daher nur sehr wenig in Erscheinung treten, sodaß man mit einer Halbwertszeit von 2 Stunden für den Abbau *in vitro* rechnen kann.

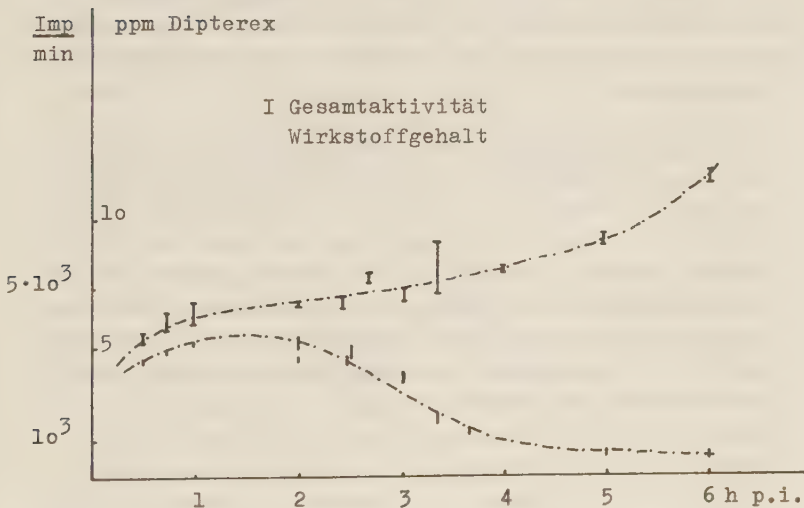


Fig. 11: Dipterex im Darminhalt des Schweines nach sbc.-Injektion von 25 mg/kg nach SCHWARZ und DEDEK (1965)

Im Vergleich zum Blut erfolgt also der Wirkstoffabbau im Darminhalt mit wesentlich geringerer Geschwindigkeit. Nimmt man an, daß der Abbau im Darminhalt in vivo mit gleicher Geschwindigkeit erfolgt (pH-Unterschiede bleiben hierbei unberücksichtigt), so sollte die Verweilzeit im Darminhalt sogar größer sein als die Verweilzeit im Blut.

In Figur 11 werden die Ergebnisse von insgesamt 3 in vivo Versuchen zusammengefaßt. Wie im Blut bestehen zu Beginn etwa 90 % der Gesamtaktivität aus Dipterex, dessen Anteil hier wesentlich langsamer abnimmt als im Blut. 2 Stunden p.i. bestehen noch etwa 80 % der Gesamtaktivität aus Dipterex, 6 Stunden p.i. noch etwa 10 %. Die Gesamtaktivität nimmt im Gegensatz zum Blut laufend zu. 6 Stunden p.i. ist sie etwa doppelt so hoch wie im Blut, offenbar werden in steigendem Maße auch phosphorhaltige Abbauprodukte des Dipterex in den Darminhalt ausgeschieden.

Die Wirkstoffkonzentration im Darminhalt erreicht bereits nach 20 min mit 4 - 5 ppm den Maximalwert welcher bis etwa 2,5 Stunden p.i. aufrechterhalten wird. 5 - 7 Stunden p.i. konnte noch etwa 1 ppm nachgewiesen werden. Aus Figur 10 und 11 ist ersichtlich, daß die Wirkstoffkonzentration im Darminhalt bei längeren Zeiten (über 6 Stunden p.i.) etwas größer ist als im Blut, was aus der in vitro gemessenen Abbaugeschwindigkeit des Dipterex bereits zu erkennen war.

2. Hauptabbauwege von Dipterex nach ARTHUR und CASIDA
(1957)

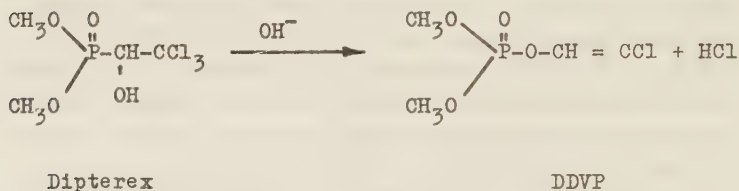
In vitro Studien des Pestizidmetabolismus in Leber und Niere der Säugetiere von ARTHUR und CASIDA haben gezeigt, daß die Hauptabbauprodukte Dimethylphosphat und Monomethylphosphat sind. Der erste Schritt im Metabolismus von Dipterex ist dabei die Hydrolyse der Phosphatbindung (C-P). Nach den Ergebnissen von HASSAN (1965), der sich intensiv mit dem Metabolismus von Dipterex im Nervengewebe von Säugern und den kinetischen Vorgängen, die mit seiner Reaktion mit der Acetylcholinesterase verbunden sind, befaßte, scheint es, daß der Hauptabbauweg der Insektizide im Nervengewebe die Hydrolyse der Methyl-esterbindungen einschließt. Diese Schlußfolgerung konnte aufgrund der O-Methyl-2,2,2-trichloro-1-hydroxy-äthyl-phosphorsäurebestimmung durch die Papierchromatographie und den FUJIWARA-Test bekräftigt werden. Die Bildung von monodemethyliertem Dipterex und von Monomethylphosphat zeigt an, daß die Phosphormonoesterase in den Metabolismus von Dipterex im Nervengewebe verwickelt ist.

Kinetische Studien des Acetylcholinesterase-Dipterex-Systems erbrachten einen pI_{50} -Wert von 5,2 . Die progressive Natur der Hemmung weist auf eine irreversible Hemmung der Enzyme hin und die Wirksamkeit des Inhibitors wird durch eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante wiedergegeben. Hieraus ergab sich, daß die Reaktion von der Inhibitor- und der Enzymkonzentration abhängt. Die irreversible Hemmung durch Dipterex weist darauf hin, daß die Acetylcholinesterase nicht an der Ent-

giftung der Insektizide irgendwie beteiligt ist.

Studien, die sich mit dem Enzymschutz durch das Substrat befassen, zeigen einen kompetitiven Effekt. Das Substrat schützt das Enzym vor Dipterex durch Reduktion der Hemmungsreaktionskonstante. Die Konkurrenz zwischen Acetylcholin und Dipterex für das Enzym weist darauf hin, daß sich die phosphororganischen Verbindungen selbst an die Substratbindungsgruppe im aktiven Zentrum befestigen.

Es ist bekannt, daß aus dem Phosphorsäureester Dipterex im neutralen und alkalischen Milieu durch HCl-Abspaltung der Phosphorsäureester DDVP entstehen kann:



Die insektizide und Warmblüter Toxizität des DDVP ist durchschnittlich etwa 10 mal so groß wie die von Dipterex, sodaß die möglicherweise in vivo stattfindende Bildung des DDVP aus Dipterex von besonderem Interesse ist. Aus den in vitro Untersuchungen geht hervor, daß die in vivo zu erwartenden Mengen an DDVP höchstens wenige Prozent des Dipterex-Anteils betragen können.

II. DDVP-Abbau Einfluß von Aktivatoren (Metallionen)
nach HODGSON und CASIDA (1962)

DDVP kann anfänglich entweder an der P-O-vinyl- oder der P-O-methyl-Gruppierung hydrolysiert werden. Das Anfangsprodukt der ersteren Reaktion ist das Dimethylphosphat, das im Stoffwechsel nicht weiter abgebaut wird und das Anfangsprodukt der letzteren Reaktion das Desmethylphosphat, das von Rattenleberpräparaten weiter abgebaut wird. Das Stoffwechselprodukt der Mitochondrienenzyme war meist gänzlich Dimethylphosphat. Desmethyl-DDVP und Monomethylphosphat dagegen wurden mit den löslichen Enzymen ebenso gebildet. Dies zeigt an, daß in den Mitochondrien die einzige bezeichnende Hydrolyse die ist, die an der P-O-vinyl-Bindung angreift, wohingegen in der löslichen Fraktion sowohl die P-O-vinyl- als auch die P-O-methyl-Bindung angegriffen wird.

Die Wirkung von Metallionen auf die Beschaffenheit der Produkte, die aus DDVP durch die Einwirkung der Subzellularfraktionen entstanden, konnten mit Hilfe eines Ionenaustauschchromatographen genau untersucht werden: Manganionen, die man den löslichen Enzymen zusetzte, erhöhten die Bildung von Dimethylphosphat und verminderten das Verhältnis von Desmethyl-DDVP und Monomethylphosphat. Calciumionen, die man den Mitochondrienpräparaten zumischte, dienten nur dazu die Produktionsrate des Dimethylphosphats zu steigern. Diese bivalenten Kationen schienen nur die Enzyme zu aktivieren, die die P-O-vinyl-Bindung spalteten.

Die Desmethyl-DDVP-Hydrolyse durch Rattenleberenzyme:

Die Desmethyl-DDVP-Hydrolyse stellte sich nur bei der löslichen Fraktion ein. Kobaltionen konnten auf diese Fraktionen dann stimulierend wirken, wenn man sie in einer Konzentration von 1×10^{-3} M zusetzte, wohingegen gleiche Konzentrationen von Calcium-, Magnesium-, Mangan- und Strontiumionen keinerlei Wirkung zeigte. Eine weitere Nachforschung zeigte, daß die stimulierende Wirkung des Kobalt nur in den Konzentrationsbereich $2,5 \cdot 10^{-5}$ - $2,5 \cdot 10^{-4}$ Mol fiel. Obgleich die Wirksamkeit verschiedener Präparate bei Abwesenheit des Kobalt variierte, war das Stimulationsergebnis von $1 \cdot 10^{-4}$ Mol Kobalt in jedem Experiment konstant und betrug das 2,4-fache.

Die anfängliche Hydrolyse von Desmethyl-DDVP kann auch an einer anderen Esterstelle stattfinden. Falls die anfängliche Spaltung an der P-O-methyl-Kette erfolgt, würde beides, das anorganische Phosphat und der Dichloracetaldehyd in äquimolarer Konzentration bei der Hydrolyse des 2,2-Dichlorovinylphosphats entstehen. Falls die P-O-vinyl-Spaltung den Anfangsschritt darstellt, entsteht der Dichloracetaldehyd bei der ersten und das anorganische Phosphat bei der zweiten Reaktion. Aufgrund der Untersuchungen ergab sich, daß die Monomethylphosphathydrolyse in diesen Enzympräparaten langsam verläuft und daß, falls der zweite Mechanismus abläuft, deshalb der Betrag des entstandenen Dichloracetaldehyds bei weitem größer ist (2 - 3 mal) als der des anorganischen Phosphats.

Hydrolyse des Monomethylphosphats durch Rattenleberenzyme:

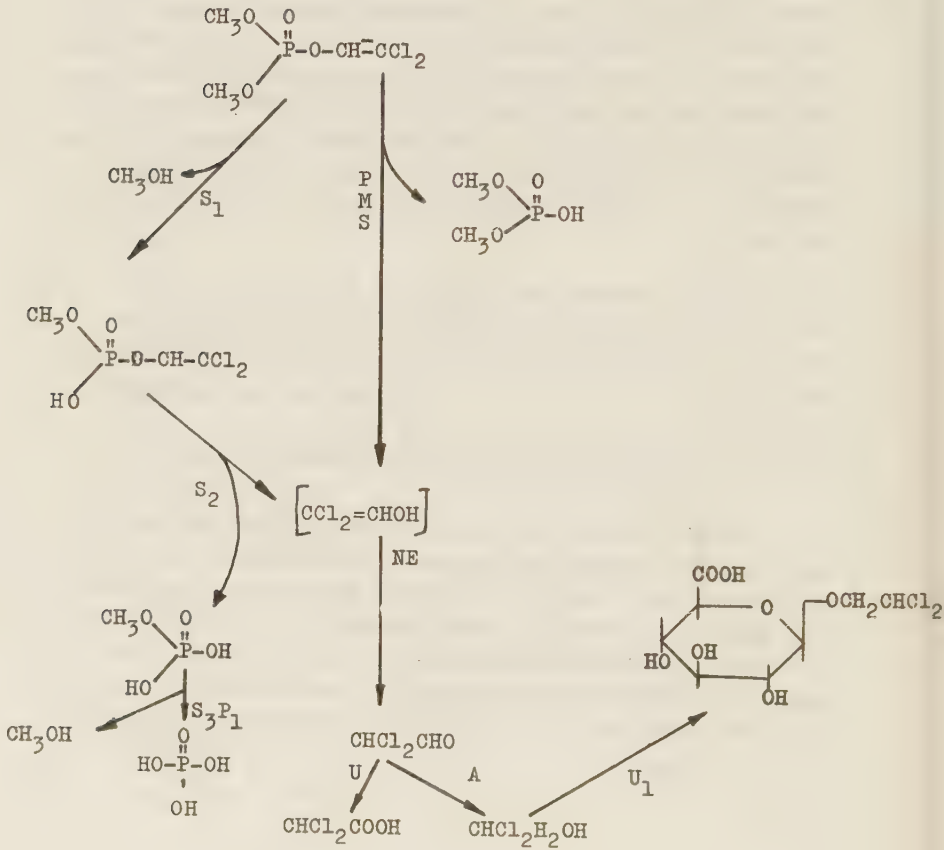
Die Zufuhr von 1×10^{-3} - 1×10^{-5} M Mengen von Calcium-, Kobalt-, Magnesium-, Mangan- oder Strontiumionen konnte keine Stimulierung dieses langsamen Abbaus erzielen. Das Enzym war im löslichen Teil der Zelle lokalisiert und das pH-Optimum für die Hydrolyse lag zwischen 6,8 und 7,2. Hg- und Ag-Ionen, p-Chlorquecksilberbenzoat und o-Jodobenzoat waren effektive Hemmsubstanzen für die Hydrolyse; die Prozenzhemmung, die die Hemmsubstanzen bei 2×10^{-4} N erzeugten, lag jeweils bei 64,64, 43 und bei 14.

Auch im Rattenplasma war ein Enzym für die Hydrolyse des Monomethylphosphats wirksam. Jedoch zeigte das Enzym in der Leber die rund 5-fache Wirkung von dem Plasmaenzym.

Der Abbau des Dichloracetaldehyds durch die Alkoholdehydrogenase:

In Gegenwart von reiner Alkoholdehydrogenase oder eines rattenleberlöslichen Präparates verursacht der Dichloracetaldehyd die rasche Oxydation des DPNH. Er wird dabei selber zum Dichloräthanol reduziert. Dies scheint der Hauptabbauweg zu sein. Ein sehr kleiner Betrag erscheint aber auch als Säurederivat, wahrscheinlich als Dichloressigsäure. Jedoch ist dieser Mechanismus noch nicht erforscht.

Stoffwechselweg des DDVP in der Ratte basierend auf in vitro Versuchen nach HODGSON und CASIDA:



- P = Plasmaenzym, das DDVP zu Dimethylphosphat hydrolysiert; evtl. Aktivatoren nicht erforscht
- P₁ = Plasmaenzym, das Monomethylphosphat zu anorganischem Phosphat hydrolysiert; evtl. Aktivatoren nicht erforscht
- S = Lösliches Enzym, das DDVP zu Dimethylphosphat hydrolysiert; Aktivator Mn⁺⁺
- S₁ = Lösliches Leberenzym, das DDVP zu Desmethyl-DDVP hydrolysiert; evtl. Aktivatoren nicht erforscht
- S₃ = Lösliches Leberenzym, das Monomethylphosphat zu anorganischem Phosphat hydrolysiert; keine Aktivatoren bekannt; Hemmstoffe: -SH-Hemmer; pH-Optimum: 6,8 - 7,2
- M = Lebermitochondrienenzym, das DDVP zu Dimethylphosphat hydrolysiert; Aktivator: Ca⁺⁺
- A = Reduktion des Dichloracetaldehyds zu Dichloräthanol durch die Alkoholdehydrogenase; erfordert DPNH
- NE = Nichtenzymatisch
- U und U₁ Möglicher Stoffwechselweg; Enzymbeschaffenheit noch nicht erforscht.

III. Gegengiftmaßnahmen (Atropin, P₂AM, Toxogonin),
Grenzen der Antidotwirksamkeit nach JAUQUES (1964)

Wie bereits anfangs angegeben wurde, besteht die hauptsächlichste pharmakologische Wirkung der phosphororganischen Pestizide darin, die Acetylcholinesterase zu blockieren oder zu hemmen. Dieses Enzym ist jedoch für die eigentliche Nerventätigkeit nötig.

Es wird im allgemeinen angenommen, daß diese Hemmung durch Phosphorylation auftritt, durch Bildung eines stabilen Enzymkomplexes. Die Hemmung des Enzyms ermöglicht es dem Acetylcholin sich anzusammeln und die stimulierenden Wirkungen auf das Parasympathische Nervensystem zu verdoppeln.

RADELEFF und WOODARD (1964) berichteten, daß die charakteristischen Symptome für eine Vergiftung mit phosphororganischen Verbindungen folgende sind: Steifheit der Körperglieder, Dyspnoe, eine überreiche Speichelbildung und es können noch andere Symptome vorhanden sein, wie Zyanose, Diarrhoe, Depression, Inkoordination, muskuläre Fasciculation und Tremor, ferner Schwäche.

Antidotwirkung von Atropin, allein oder in Kombination mit P₂AM (Pyridin-2-aldoxin-methyljodid) oder bis -4-hydroxyimino-methylpyridinium-(1)-methyl -äther dichlorid (Toxogonin^R):

Die Untersuchungen von R. JAUQUES an Mäusen, die mit einer LD₉₀₋₁₀₀ DDVP-Dosis (30 mg/kg s.c.) vergiftet waren,

ergaben, daß Atropin schon bei so geringen Dosen wie 0,3 mg/kg seine Schutzwirkung entfaltete, größere Dosen lieferten vergleichbar bessere Schutzwirkungen. Bei der Anwesenheit von P_2AM zeigte eine Dosis von 30 mg/kg Wirksamkeit. Eine höhere Überlebensrate resultierte aus der Verabreichung höherer Dosen. Wenn Atropin- und P_2AM -Dosen, die bei Einzelverabreichung nur eine Teilschutzwirkung lieferten (ED_{40} - ED_{60}) kombiniert wurden, so erhielt man eine nahezu totale oder totale Schutzwirkung, d.h. die Wirkungen der Verbindungen addierten sich mehr oder weniger.

Toxogonin war im Groben genauso wirksam wie P_2AM , wenn man es allein injizierte. In Kombination mit Atropindosen, die bei Einzelverabreichung eine nur teilweise Schutzwirkung lieferten, ergänzte Toxogonin die Schutzwirkung des Atropin bei Dosen, die 2-10 mal kleiner waren als die von P_2AM . Es schien daher so, daß letztere Verbindung im Falle einer DDVP-Vergiftung in Kombination mit Atropin von geringerem Wert ist als Toxogonin.

Grenzen der Antidotwirksamkeit:

Es ist der Versuch gemacht worden, die Gegengiftwirkung einer festen Kombination von Atropin und P_2AM gegen wachsende Beträge von DDVP festzustellen. Beide Drogen wurden zu einer einzigen Dosierung kombiniert, die, wenn man sie einzeln verabreichte, eine 40-50 %ige Schutzwirkung erreichen würde. Den auf diese Weise vorbehandelten Mäusen wurden DDVP-Mengen injiziert, die von der einfachen LD_{90-100} -Dosis bis zu einer Steigerung um das 4-fache des Betrages reichten. Die Überlebensrate wurde 48 Stunden nach der DDVP-Verabreichung bestimmt. Zu dieser Zeit

zeigte keines der überlebenden Tiere irgendwelche Vergiftungsanzeichen. Die Wirkungen von Atropin und P_2AM waren bei einer LD_{90-100} -Dosis additiv. Nach einer Steigerung der DDVP-Dosis entwickelte sich ein kompetitiver Antagonismus zwischen der Antidotkombination und dem Gift.

E) DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

Die Dünnschichtchromatographie besitzt eine sehr große Bedeutung für die Analyse insektizider Phosphorsäureester, was in ihrer hohen Aufnahmefähigkeit, ihrer hohen Lösungskraft, sowie der schnellen und leichten Durchführung begründet liegt. Einerseits verwendet man sie zum Nachweis oder zur Bestimmung von Organophosphorverbindungen und deren Rückständen, andererseits stellt sie eine praktische Methode zur quantitativen Ermittlung des Wirkstoffgehaltes von Formulierungen dar. Daneben findet die DSC vielfach Anwendung als "clean-up"-Verfahren vor einer der üblichen Bestimmungsmethoden wie z.B. der Gaschromatographie, Spectrophotometrie, IR-Analyse, Kolometrie oder der enzymatischen Analyse.

WALKER und BEROZA (1963) gaben die Rf-Werte für Dipterex und DDVP in 19 verschiedenen Lösungsmittelsystemen an. Als chromogene Reagenzien dienten die von MITCHEL (1960/1) angegebenen Lösungen (Fluoreszinlösung mit Zusätzen, Silbernitratlösung mit Zusätzen).

1964 wurde von STANLEY die Verwendung von Microchromatoplaten angeregt, was eine ökonomische, schnelle DSC-Methode darstellt.

Für die Bestimmung des Verdauungskanalinhaltes erwies sich eine von BECK und SHERMAN (1968) angegebene Methode als wirksam, die sich ebenfalls auf den Cl-Nachweis durch das Silbernitratreagens stützte.

SALAME (1964) konnte die Rf-Werte für DDVP für 16 Fließmittelsysteme angeben. Als chromogene Reagenzien dienten Bromdampf, eine 0,1 %ige FeCl_3 -Lösung in 80 % Alkohol sowie eine 1 %ige Sulfosalicylsäurelösung in 80 % Alkohol.

Eine 1 %ige, acetonische Lösung von Kobaltchlorid wurde von DONNER und LOHS (1965) als Chromogenreagenz angegeben. Die Rf-Werte sind für zwei Laufmittel für Dipterex und DDVP genannt. Nach GUTH (1967) erwiesen sich eine 4-(4-nitrobenzyl)pyridinlösung in Aceton sowie eine Tetraäthylenpentaminlösung in Aceton (oder eine Morphinlösung) als geeignete Sprühreagenzien. GUTH's Verdienst lag in der Untersuchung von 17 Laufmittelsystemen für die die Rf-Werte für Dipterex und DDVP angegeben sind.

GETZ und WHEELER (1968) hingegen untersuchten verschiedene Adsorptionsmaterialien (Rf-Werte sind für Dipterex und DDVP aufgeführt).

Nach den Untersuchungen von SALO und SALMINEN (1966) erwies sich das Natriumsalz der 3,5-Dihydroxypyren-8,10-disulfonsäure als hervorragendes Entwicklungsmittel. Rf-Werte für DDVP und Dipterex werden aufgeführt.

Die Kombination des enzymatischen Hemmtests mit chromatographischen Verfahren dürfte für die Analytik esterasehemmender Verbindungen wie der Insektiziden Organophosphate und Carbaminsäureester neben der Gaschromatographie größte Bedeutung erlangen.

Die Versuchsanordnungen und Ergebnisse von ACKERMANN (1968), ORTLOFF und FRANZ (1965) und von WINTERLIN, WALKER und FRANK (1968) sind angegeben. Die nachweisbare Menge betrug nach ACKERMANN für DDVP 0,2 µg, für Dipterex 50 - 100 µg. Somit konnte die gegenüber chemischen Nachweisreaktionen höhere Empfindlichkeit des enzymatischen Hemmtests auf dem Dünnschichtchromatogramm aufgezeigt werden.

Eine weitverbreitete Methode zur Trennung und Bestimmung von phosphororganischen Insektiziden und ihrer Metabolite stellt die Papierchromatographie dar.

Nach der Methode von MACRAE und McKINLEY (1961), die auf der Bindung von Eisen-III-Ionen durch die Phosphatestergruppen und der Reaktion des freien Eisen-III-chlorids mit Sulfosalicylsäure beruht, konnte der Rf-Wert für Dipterex erfolgreich bestimmt werden.

COOK (1955) erfand eine Methode für die optische Bestimmung von in vitro Hemmern in situ auf Papierchromatogrammen.

Von MITCHEL (1961) sind Silbernitrat + 2-Phenoxyäthanol und Brom + Fluoreszin als geeignete Reagenzien zur erfolgreichen Identifizierung von Dipterex angegeben worden.

Phosphororganische Verbindungen wie Dipterex, DDVP, TEPP, Paraoxon, Parathion, Methylparathion, EPN, Diazinon, Phosdrin und DOW-ET-14 ergaben eine positive Reaktion mit Benzidin-Na-Perborat (Reaktion der Phosphorsäureester mit Peroxid-Amin-Kombinationen

nach SCHÖNEMANN). Aber Malathion, Pestox-3, Gusathion, Systox und Metasystox, anorganische Phosphorverbindungen, Arsenate und Silikate, andere Gifte und Arzneimittel reagierten auf diesen Test meist negativ und konnten so klar von den phosphororganischen Verbindungen abgetrennt werden. Diese Methode war auf 2 μ g Dipterex und DDVP anwendbar.

Der Test mit HANES-ISHERWOOD-Reagens ist positiv für Dipterex, DDVP, anorganische Phosphatverbindungen, Arsenat sowie Silikat. Zur Abtrennung des anorganischen Phosphats von den letzteren Verbindungen muß der Test nach der Extraktion der Proben mit organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden.

Chlorierte phosphororganische Verbindungen wie Dipterex, DDVP, DOW-ET 14 und Chlorthion konnten durch die Darstellung des Chlor von den anderen phosphororganischen Verbindungen getrennt werden.

Auf die quantitative Erfassung des abgespaltenen Chlor mit Hilfe der potentiometrischen Titration haben BENNEWITZ und FOTH (1967) hingewiesen.

DDVP und Phosdrin (ungesättigt) konnten aufgrund der Reduktion von KMnO_4 von Dipterex und von anderen phosphororganischen Verbindungen getrennt werden.

Dipterex und DDVP mit einem Methoxyradikal konnten qualitativ und quantitativ durch ihre Hydrolyse zu Methanol bestimmt werden, das durch die Chromotropsäuremethode erfaßt wurde. Diese Methode konnte auf 10 μ g Mengen von Dipterex und DDVP angewendet werden.

GEIGER und FUEERER (1960) gaben 2 Methoden an, die sich für die Bestimmung von Makromengen DDVP eigneten. Die erste beruht auf der jodometrischen Bestimmung des durch alkalische Spaltung gebildeten Dichloracetaldehyds. Bei der zweiten wird der durch alkalische Hydrolyse abgespaltene Phosphorsäuredimethylester acidimetrisch erfaßt.

Die Dichromatoxydation und der Pyridinalkali-FUJIIWARA-Test stellt eine vereinfachte colorimetrische Methode dar und kann zum Nachweis von Dipterex angewendet werden. Die Methode ist auf 20 µg Dipterex anwendbar, andere phosphororganische Verbindungen reagierten auf diesen Test negativ.

Eine rasch durchzuführende Methode zur Mengenbestimmung von Dipterex und seiner höheren Homologe haben MUSTAFA und Mitarb. (1966) angegeben. Sie beruht auf der Spaltung der Phosphor-Carbon-Bindung in den -hydroxyphosphat Derivaten und beinhaltet die Bestimmung des durch Wechselwirkung mit 3,5-Dinitrobenzoesäure in Anwesenheit von Alkali gebildeten Dialkylphosphits, wobei sich eine blauviolette Farbe bildet. So kleine Mengen wie 20 ppm Dipterex können dabei ohne Schwierigkeiten bestimmt werden. Diese Methode ermöglicht die Differenzierung zwischen Dipterex und DDVP.

Das modifizierte Agar-Diffusionsverfahren nach ACKERMANN und Mitarb. (1968) ermöglicht den Nachweis von 0,05 mg/l Dipterex + DDVP, jedoch keine getrennte Bestimmung der beiden toxischen Komponenten.

In einem abschließenden und weiterleitenden Abschnitt ist der Versuch unternommen worden, anhand einiger Studien kurz auf die wichtigsten Stoffwechseldaten (Toleranzentwicklung, Abbaugeschwindigkeit, Hauptabbauwege, sowie Gegengiftmaßnahme) von Dipterex und DDVP einzugehen.

F) LITERATURVERZEICHNIS

ACKERMANN, J., R. ENGST und G. FECHNER:

Methode zur getrennten Bestimmung von Trichlorphos-
und Dichlorphos-Rückständen in Milch.

Z. Lebensm. Forsch. 137 (5), 303 (1968)

ACKERMANN, H.:

Dünnschichtchromatographisch-Enzymatischer Nachweis
phosphororganischer Insektizide, Aktivierung
schwacher Esterhemmer.

J. Chromatogr. 36, (3) 309 (1968)

ALDRIDGE, W.N. und J.M. BARNES:

Esterases and neurotoxicity of some organophos-
phorus compounds.

Biochem. Pharmacol. 15, (5) 549 (1966)

ARTHUR, B.W. und I.E. CASIDA:

Metabolism and selectivity of O,O-dimethyl-2,2,2-
trichloro-1-hydroxyethylphosphonate and its
reaction products.

J. Agr. Food Chem. 5, 186 (1957)

BECK, J. und M. SHERMAN:

Detection by thin-layer chromatography of organo-
phosphorus insecticides in acutely poisoned rats
and chickens.

Acta Pharmacol. Toxicol. 26, (1) 35 (1968)

BENNEWITZ, R. und G. FOTH:

Beitrag zum chemischen Verhalten und zur analytischen Bestimmung von Trichlorphon, Dichlorvos und Tribuphon.
Z. Anal. Chem. 229, (2) 110 (1967)

BUECHLER, W. und W. HEIZLER:

Zur colorimetrischen Bestimmung von O,O-Dimethyl-2,2-dichloro-vinylphosphat (DDVP).
Z. Anal. Chem. 194, 422 (1963)

BUECHLER, W., W. HEIZLER und R. FUERER:

Zur colorimetrischen Bestimmung von O,O-Dimethyl-2,2-dichlorovinylphosphat (DDVP).
Z. Anal. Chem. 213, (1) 28 (1965)

COOK, J.W.:

Paper Chromatography of some Organic Phosphate Insecticides. IV. Spot Test for in vitro Cholinesterase Inhibitors.
J. Assoc. Offic. Agr. Chemists 38, 150 (1965)

COOK, J.W.:

Conversion of Organic Phosphates to in vitro Cholinesterase Inhibitors by N-Bromosuccinimide and Ultraviolet Light.
J. Assoc. Offic. Agr. Chemists 38, 826 (1955)

DONNER, R. und K.H. LOHS:

Kobaltchlorid zum Nachweis phosphororganischer Ester auf Papier- und insbesondere Dünnschichtchromatogrammen.
J. Chromatogr. 17, (2) 349 (1965)

GEIGER, M. und R. FUERER:

Über die analytische Bestimmung von O,O-Dimethyl-
2,2-dichlorvinylphosphat (DDVP)
Z. Anal. Chem. 174, 401 (1960)

GETZ, M. und H. WHEELER:

Thin Layer Chromatography of Organophosphorus
Insecticides with Several Adsorbents and Ternary
Solvent Systems.
J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 51, (5) 1101 (1968)

GIANG, P.A., W.F. BARTHEL und S.A. HALL:

Colorimetric determination of O,O-dialkyl-1-
hydroxyalkyl-phosphonates derived from chloral.
J. Agr. Food Chem. 2, 1281 (1954)

GUTH, J.:

Ein dünn-schichtchromatographischer Trennungsgang
für insektizid-wirksame Phosphorsäureester.
Pflanzenschutzberichte 35, (9-10) 129 (1967)

HASSAN, A., S.M.A.D. ZAYED und F.M. ABDEL-HAMID:

Metabolism of Organophosphorus Insecticides.
II. Metabolism of O,O-Dimethyl-2,2,2-Trichloro-1-
Hydroxylthyl Phosphonate (Dipterex) in Mammalian
Nervous Tissue and Kinetics involved in its
Reaction with Acetylcholin Esterase.
Can. J. Biochem. 43, (8) 1263 (1964)

HODGSON, E. und J.E. CASIDA:

Insecticide Metabolism in Mammals. Mammalian
Enzymes involved in the Degradation of 2,2-Dichloro-
vinyl Dimethyl Phosphate.
J. Agr. Food Chem. 10, 208 (1962)

HUGHES, J.T.:

Colorimetric Determination of Low Concentrations of
2,2-Dichlorovinyl Dimethyl Phosphate in the Atmosphere.
Analyst. 88, 318 (1963)

JAQUES, R.:

The protective effect of pyridin-2-aldoxin methiodide
(P₂AM), bis- 4-hydroxy-imino-methyl-pyridinium-1-
methyl -ether dichloride (Toxogonin^R) and atropin
in experimental DDVP poisoning.
Helv. Physiol. Pharmacol. Acta 22, (3) 174 (1964)

KIERMEIER, F., R. KERN und G. WILDBRETT:

Einfluß organischer Insektizide auf Enzyme.
Z. L. bensm. Untersuch.-Forsch. 118, 201 (1962)

KOLYAKOVA, V. Ya.:

Separation of a mixture of chlorphos, DDVP, Chloral
and Dimethyl Phosphorus Acid by thin layer chroma-
tography.

Tr.Vses.Nauch. Issled. Inst. Vet.Sanit. 29, 348 (1967)

LOHS, K.H. und P. FRANZ:

Zur Analytik hochtoxischer Phosphorsäureester.
Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 26, 451 (1961)

LOHS, K.H. und W. DOEPEL:

Nachweis und Bestimmung phosphororganischer
Insektizide mit der Schönemann-Reaktion.
Z. Chem. 7, (3) 106 (1967)

LOHS, K.H. und R. DONNER:

Die Schönemann-Reaktion zum Nachweis von
Thiophosphorsäureestern.
Z. Chem. 6, (6) 224 (1966)

MACRAE, H.F. und W. P. MCKINLEY:

Chromatographic Identification of Some Organophosphat Insecticides.

J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 44, 207 (1961)

METCALF, R., M.Y. WINTON und T.R. FUKUTO:

The effect of Cholinergic substances upon the isolated heart of *Periplaneta americana*.

J. Insect. Physiol. 10, (2) 353 (1964)

MITCHEL, L.C.:

The Effect of Ultraviolet Light (2537 Å) on 141 Pesticide Chemicals by Paper Chromatography.

J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 44, 643 (1961)

MITSUI, T., H. OZAKI, H. KUMANO und H. SANO:

Insecticide Determination. I. Colorimetric Determination of Dimethyl 2,2-Dichlorovinyl Phosphate (DDVP).

Chem. Pharm. Bull. 11, (5) 619 (1963)

MUSTAFA, A., M. SIDKY, Z.I. EL-DARAWY und H. KAMEL:

Colorimetric Determination of O,O-dimethyl (1-hydroxy-2,2,2-trichlorethyl)-phosphonate and its Higher Homologs.

J. Agr. Food Chem. 14, (5) 503 (1966)

ORTLOFF, R. und P. FRANZ:

Two methods of biochemical detection of phosphorus containing insecticides on thin layer chromatograms.

Z. Chem. 5, (10) 388 (1965)

RAGAB, M.T.H.:

Direct fluorescent Detection of Organophosphorus
Pesticides and Some of Their Sulfur-containing
Breakdown Products After Thin Layer Chromatography.
J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 50, (5) 1088 (1967)

RAHN, H.W.

Über die Möglichkeit der Trichlorphonschädigung
bei Jungtieren laktierender Ratten.
Arch. Exptl. Veterinaarmed. 18, (4) 713 (1964)

SADO, T. und K. SALMINEN:

Dünnschichtchromatographie der Pestizide.
Z. Lebensm. Untersuch.-Forsch. 129, (3) 149 (1966)

SALAME, M.:

Identification et fractionnement des principaux
insecticides organophosphorés par chromatographie
en couche mince.
J. Chromatogr. 16, (3) 476 (1964)

SCHWARZ, H. und W. DEDEK:

Untersuchungen über den Abbau und die Ausscheidun-
gen von ^{32}P -markiertem Trichlorphon beim Schwein.
Zentr. Veterinaarmed. Reihe B 12, 653 (1965)

SERA, K., A. MATSUNAGA, A. MURAKAMI, I. SATO,
K. YAMASHITA und H. YOSHIMORI:
Qualitative Analyses of Organic Phosphorus
Color Reactions and Simple Detection.
Kamumato Med. J. 12, 193 (1959)

SHIMAMOTO, K. und K. HATTORI:

Effects of Chronic Feeding of the Organic Phosphorus Compounds on the Tissue Cholinesterase in Rats.

Acta Schol. Med. 39, (3) 128 (1966)

STANLEY, C.W.:

Thin-layer Chromatography of Organophosphorus Pesticides and Acids on Microchromatoplates.

J. Chromatogr. 16, (3) 467 (1964)

SUN, Y.P. und E.R. JOHNSON:

A new Bioassay Technique with Special Reference to the Specific Bioassay of DDVP Insecticide.

J. Econ. Entomol. 56, (5) 635 (1963)

WALKER, K. und M. BEROZA:

Thin Layer Chromatography for Insecticide Analysis.

J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 46, 250 (1963)

WINTERLIN, W., G. WALKER und H. FRANK:

Detection of Cholinesterase-Inhibiting Pesticides Following Separation on Thin Layer Chromatograms.

J. Agr. Food Chem. 16, (5) 808 (1968)

YAMASHITA, K.:

Studies on Organic Phosphorus Dipterex.

III. Detection and Discrimination of Dipterex and its vinyl Derivative (DDVP).

Kumamoto Med. J. 14, 13 (1961)

YOUNGER, R.L. und R.D. RADELEFF:

Use of pyridin-aldoxime Methochlorid in the Treatment of Organic Phosphorus Compound Poisoning in Livestock.

Am. J. Vet. Res. 25, 982 (1964)

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Weinig danke ich für die freundliche Unterstützung durch Überlassung eines Arbeitsplatzes, für Ratschläge bei der Abfassung der Arbeit und die Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. rer. nat. G. Machbert danke ich aufrichtig für seine vielfältigen und wertvollen Anregungen bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau Bocklage danke ich für ihre tätige Bereitschaft und für ihre unermüdliche Mithilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 8.1.1948 wurde ich, Manfred Berreis, als Sohn des Elektromeisters Nikolaus Berreis und seiner Ehefrau, der Fachoberlehrerin Margarethe Berreis geb. Engelhardt, in Forchheim/Obf. geboren. In Wiesenthau trat ich am 1.9.1952 in die erste Klasse der Grundschule ein. Mit dem Beginn des dritten Grundschuljahres übersiedelten wir in die Kreisstadt Forchheim. Hier besuchte ich ab 1.9.1954 die dritte Klasse der Grundschule und mit dem Abschluß des vierten Grundschuljahres legte ich die Aufnahmeprüfung am Gymnasium Forchheim ab. Zu Beginn des Schuljahres 1956/57 trat ich in die erste Klasse des naturwissenschaftlichen Zweiges (Physik, Chemie, großes Latein) dieser Schule ein. Meine 9-jährige Schulzeit absolvierte ich ohne Unterbrechung (weder Krankheit noch Wiederholung) und unterzog mich am 2.7.1967 der Reifeprüfung. Das Zeugnis der Reife erhielt ich am 21.7.1967.

Im Sommer 1967 bewarb ich mich über die Zentrale Registrierstelle in Hamburg um die Zulassung zum Studium der Zahnmedizin an der Universität Erlangen-Nürnberg, das ich dann im Wintersemester 1967/68 an dieser Universität aufnahm. Im Juli 1968 legte ich das Vorphysikum, im Februar 1970 das Physikum ab.

Im Wintersemester 1970/71 begann ich am Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg mit meiner Doktorarbeit.

Das Zahnmedizinische Staatsexamen legte ich im Sommersemester 1972 mit dem Gesamtergebnis sehr gut ab.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990
